

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**Determinación de hormonas proteicas por métodos
radioinmunológicos**

TESIS

para optar el grado de Doctor en Medicina

AUTOR

Fausto Anibal Garmendia Lorena

Lima – Perú

1972

A Lina, Francisco y Carlos Felipe

Por su abnegada identificación con los
sacrificios y renunciias de un médico

A mis padres y hermanos

Ejemplo, enseñanza y estímulo

*A la memoria de mi
abuelo, Dr. Antonio Lorena*

Permanente fuente de inspiración

A mis maestros

Drs.: Carlos Subauste
Otto Weller
Ernst F. Pfeiffer
Carlos Lanfranco
Seymour Glick
J. Lester Gabrilove

con modestia e imperecedero agradecimiento

AGRADECIMIENTOS

A mis colaboradores: Dr. Héctor Valdivia, Srtas. Elva Fernández, Inés León, Hilda Benavides, Delia Flores, Elizabeth Espejo, cuya ayuda facilitó la mejor realización de esta tesis.

Drs. Esteban Kesserü y Luis A. Llerena por su colaboración y consejos.

Sra. María Eugenia de Perales por su permanente cooperación mecanográfica.

Sr. Edgar Florentini por la confección de una parte importante de dibujos y fotografías.

Schering AG Berlín e Instituto Hipólito Unanue por su confianza al habernos concedido donativos, que permitieron la financiación de una parte de la labor experimental presentada en esta tesis.

I. INTRODUCCION

Hasta hace unos 15 años las proteínas y polipéptidos hormonales eran medidos sustancialmente por procedimientos biológicos (1), (2), (3), (4), que no siempre mostraban una adecuada especificidad y menos aún la necesaria sensibilidad como para dosar estas hormonas en la sangre, donde en situaciones metabólicas basales se encuentran en una concentración muy baja.

Con el objeto de dar una idea de la pequeña cantidad, en que las hormonas proteicas circulan en sangre, se presenta en el Cuadro Nº 1 una comparación de sus concentraciones con la de diversas otras sustancias, normalmente presentes en el plasma o suero.

CUADRO Nº 1

	Concentración Promedio en gr./lt.	Referencia Bibliográfica	Peso Molecular	Molaridad
Proteínas totales	75.0	(5)	69-500 mil	10^{-3} a 10^{-4}
Glucosa	0.8	(5)	180	4.4×10^{-4}
Urea	0.16	(5)	60	2.6×10^{-3}
Colesterol total	2.0	(5)	385	5.19×10^{-3}
Hidrocortisona	0.000152	(6)	362	4.14×10^{-7}
Testosterona	0.000006	(7)	288	2.08×10^{-8}
Progesterona	0.000000233	(8)	314	7.41×10^{-10}
Insulina	0.000001	(9)	6,000	1.67×10^{-10}
Hormona de crecimiento	0.000002	(10)	20- 22 mil	10^{-10}
Hormona luteinizante	0.0000018	(11)	20 mil	10^{-10}

Un avance en el dosaje de estas hormonas constituyó la introducción de los métodos inmunológicos, ya sea utilizando el procedimiento de inhibición de la hemaglutinación o la de desviación del complemento; así Wide y Gemzell en 1960 (12) pudieron determinar la hormona coriónica gonadotrófica en mujeres gestantes; Read y Bryan (13) dosaron hormona de crecimiento en acromegálicos. El problema sin embargo hubiera permanecido irresuelto para situaciones basales o de baja concentración, si es que Berson y col. (14) no hubieran demostrado, que cuando antígenos y anticuerpos se unen a un título bajo, la reacción no visible como precipitación o aglutinación, puede ser demostrada mediante el empleo de antígenos marcados con isótopos radioactivos.

Con este hallazgo se consolidó toda una época importante de la Endocrinología y aún de la Medicina Interna, la época de las hormonas proteicas. Este conocimiento permitió a Yalow y Berson en 1960 (9) delinear las características del dosaje radioinmunológico de insulina en sangre y así las bases y fundamentos de los procedimientos radioinmunológicos en general.

Mediante estas finas técnicas se han descubierto y explicado un enorme cúmulo de aspectos de la fisiología y patología en el campo de las secreciones internas, así mismo ha obligado a corregir conceptos y conocimientos aceptados como definitivamente válidos.

Se han descubierto fenómenos trascendentales como la producción y liberación de 2 tipos de insulina por el páncreas, la pro-insulina y la insulina propiamente dicha. Steiner y col. (15), (16), (17), (18) han demostrado que el monómero de insulina se deriva de la proinsulina y no por acoplamiento de sus dos cadenas principales.

Roth y col. (19) han comprobado que en la sangre circulante existen 2 tipos de insulina: una "grande" (P.M. 9,000 - 12,000) y una pequeña (P.M. 6,000). Posteriormente se ha definido que la pro-insulina e insulina grande del suero son un mismo compuesto, así como también que la insulina pequeña o insulina cristalina son idénticas (20).

Hasta hace algunos años se creía que la hormona del crecimiento tenía importancia únicamente en la época en que el organismo era capaz de crecer. Actualmente se sabe que la somatotrofina es una hormona presente aún en personas de edad avanzada y que le compete no sólo un rol estimulante del crecimiento sino un importantísimo papel en el metabolismo intermediario. Se ha podido determinar que la hormona de crecimiento no se produce en forma constante sino que se incrementa en situaciones que demandan mayor energía, tales como el esfuerzo físico, stress, ayuno, hipoglicemia, etc., estímulos que deben actuar primero a nivel hipotalámico (21) y luego mediante el factor liberador de somatotrofina son transmitidos a la hipófisis.

Desde los trabajos pioneros de Odell y col. (11) conocemos con certeza la dinámica de la producción de la hormona luteinizante. Antes de es-

tos autores se creía que ésta hormona se producía fundamentalmente en la fase luteínica del ciclo menstrual. En el momento actual se sabe que su producción es permanente a través de todo el ciclo, habiendo un notable incremento en la mitad del mismo, constituyendo lo que se suele denominar como "pico mesocíclico", probablemente responsable de la ovulación.

Podríamos así seguir relatando, ejemplos apasionantes de la dinámica de la producción de otras hormonas y polipéptidos hormonales, que son de palpitante actualidad, como la interrelación entre glucagón e insulina, hormonas de actividad opuesta, producidas por células vecinas de un mismo órgano. La función de las llamadas hormonas intestinales y la producción de insulina y glucagón, etc. (12), lo que escapa al propósito de la tesis.

Por otra parte estos métodos se han extendido al dosaje de polipéptidos o proteínas sin actividad hormonal, como la gastrina e inclusive a otras sustancias que no poseen esta estructura química, como los esteroides. Actualmente están en pleno auge las determinaciones de testosterona, progesterona, estrógenos y otras sustancias similares, mediante el uso de estos procedimientos. Para ello los esteroides actúan como haptenos acoplados a una molécula de proteína, generalmente sero albúmina bovina, dado que aisladamente no son capaces de producir anticuerpos.

Ciertamente no podíamos en nuestro medio estar indiferentes a estos cambios del conocimiento médico. Esta tesis doctoral, tiene como único mérito el de servir de introducción a estos procedimientos en nuestro país, en el cual tenemos problemas propios que resolver, como es la fisiología del hombre de altura, la alta incidencia de desnutrición, o aquéllos relacionados con el incremento rápido de la población y los métodos de control de la natalidad.

En esta tesis damos cuenta de nuestra aún pequeña experiencia con los procedimientos radioinmunológicos, desde nuestro período de entrenamiento en 1967 en el laboratorio del Dr. Seymour Glick, en el Coney Island Hospital de Nueva York, como becado de los Institutos de Salud de los Estados Unidos, hasta los obtenidos en nuestros laboratorios del Centro de Investigaciones Instituto de Biología Andina y del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Por otra parte es necesario resaltar, que parte de este trabajo se ha efectuado en colaboración con los Drs. Luis A. Llerena y Esteban Kesserü, pertenecientes a la Universidad Peruana "Cayetano Heredia"; tiene por lo tanto el significado de una estrecha, cordial y necesaria labor de cooperación entre dos Universidades, con el objeto de no duplicar esfuerzos y por el contrario de utilizar al máximo los siempre escasos recursos para la investigación médica.

II. GENERALIDADES

Todos los métodos radioinmunológicos se sustentan en el juego de 3 factores esenciales:

- 1.— Hormona estable sin marcar (standard o problema desconocido).
- 2.— Hormona marcada con iodo radioactivo.
- 3.— Antisuero específico contra la hormona que se desea determinar.

La hormona estable y la marcada deben ser iguales y muy puras para que el procedimiento llene el requisito necesario de especificidad. Al decir iguales se refiere principalmente a su capacidad inmunológica de unión al anticuerpo, dado que ambas competirán para saturar los lugares de enlace de este último. Aceptando que estos dos antígenos son idénticos, la competencia se establecerá en razón de la concentración de ambos; como mantenemos una cantidad constante de hormona marcada y de antisuero, este último se saturará en relación directa la concentración de hormona estable. Habrá tanto menor cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo cuanto mayor sea la cantidad de hormona estable, por haber sido “desplazada” o “diluida” por esta última. Como únicamente la hormona marcada es susceptible de ser medida, podemos conocer la cantidad de hormona presente en el medio de incubación indirectamente y en razón inversa, estableciendo cuanto de la hormona marcada está “unida” al anticuerpo.

Con el objetivo de llenar estas condiciones la técnica radioinmunológica de dosaje de hormonas proteicas requiere la realización de los siguientes pasos:

1. Producción del antisuero específico.
2. Titulación del antisuero.
3. Hormona pura (antígeno).
4. Marcación de la hormona con iodo radioactivo.
5. Purificación de la hormona marcada.
6. Incubación de las hormonas estable y marcada con el antisuero.
7. Separación de la hormona marcada “libre” y “unida” al anticuerpo.
8. Cuantificación de las fracciones separadas.
9. Cálculo.

1.— Producción del antisuero específico:

Los animales más corrientemente utilizados son el cobayo y el conejo, aunque se han empleado también otros animales. Lo importante reside en la inmunización de un animal de una especie diferente.

La hormona de crecimiento e insulina producen mejores antisueros en el cobayo, en cambio mejores sueros anti-hormona coriónica gonadotró-

fica se obtienen por lo general en conejos. La forma más usual de inmunización es la administración subcutánea de la hormona mezclada con adyuvante completo de Freund. Después de 3 - 4 inyecciones, efectuadas con intervalos de 11 - 15 días, se obtiene sangre por punción cardíaca, se separa el suero y almacena congelado a -20°C hasta su utilización. Posteriormente se administran inyecciones mensuales reanimantes ("booster"), con el objeto de mantener un buen título.

2.— Titulación y selección del antisuero:

Está dirigido a escoger el antisuero de mayor título y sobre todo de mayor afinidad. Con esta finalidad los antisueros son diluidos crecientemente desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Se los incuba únicamente con la hormona marcada y se establece que proporción de esta última ha quedado unida al anticuerpo. Ver Cuadro N° 8.

Generalmente se seleccionan aquellos antisueros, que a una dilución mayor de 1:10,000 unen 50% a 75% de la hormona marcada (1.0 - 3.0, expresado en la relación B/F; B = bound, unida; F = free, libre).

Esto es variable de acuerdo al tipo de hormona, así hemos podido constatar que el sistema para hormona luteinizante funciona mejor cuando la unión, anteriormente señalada, alcanza únicamente entre 30% a 40%.

Una vez que los antisueros han sido seleccionados, por su título, se los pone en contacto con cantidades conocidas de hormona standard con la finalidad de establecer su afinidad, capacidad para distinguir la menor cantidad posible de hormona estable añadida al medio de incubación. En última instancia se escoge un antisuero por su mayor afinidad, independientemente de su concentración, dado que la primera propiedad es más importante, además que no siempre se encuentra una relación directa entre afinidad y título de un antisuero.

3... Condiciones mínimas de la hormona estable:

La hormona que se utilizará para marcar con iodo, así como la empleada como standard, que usualmente es la misma, deben ser de la mayor pureza y conservar su capacidad biológica e inmunológica. Esto se consigue conservándola a congelación a -20°C . La descongelación reiterada daña dichas cualidades, por lo que el almacenaje a baja temperatura deberá ser efectuada en pequeñas cantidades para que sirva en lo posible para una sola oportunidad.

4.— Marcación de la hormona:

La técnica de marcación más difundida en la actualidad es la propuesta por Greenwood, Hunter y Glover (23), que determina la incorporación de los átomos de iodo en los radicales tirosilo de la molécula hormonal mediante el uso de cloramina —T.

La meta de la marcación está en incorporar el mayor número de átomos de iodo radioactivo con el menor daño posible de la hormona, esto

es, obtener hormona adecuadamente inmunoreactiva con la más alta actividad específica.

El proceso de marcación siempre ocasiona daño de la hormona. Este daño, llamado por ello "daño de marcación", deberá ser lo menor posible con el objeto de obtener un preparado con alta capacidad inmunoreactiva.

Por otra parte si se incorpora muy poco yodo, la actividad específica será baja, por lo que para tener un número de "cuentas" que permita medir la radioactividad presente, será necesario incrementar la masa de hormona marcada presente en el medio de incubación, que competirá con la hormona estable, haciendo disminuir con ello la sensibilidad del método.

El yodo a utilizar requiere también determinadas condiciones: 1º. Debe ser "carrier free" es decir con la menor cantidad posible de yodo estable. 2º. No debe contener contaminantes, especialmente compuestos reductores. 3º. Puede ser I-131 o I-125. 4º. Debe ser de reciente producción (fresco).

El I-131 tiene por ventajas su menor costo, es obtenido "carrier free" con mayor facilidad, posee radiación gamma de gran energía y además tiene radiación beta, lo cual permite su uso en radiocromatoelectroforesis. Como desventajas tiene, por una parte su tiempo de vida relativamente corto (8.6 días) y que su uso encierra mayor peligro.

El I-125 posee un tiempo medio de vida de 60 días pero es 3-4 veces más costoso, sólo tiene radiación gamma de baja energía. Debido a la diferencia de tiempo de vida, al marcar con I-125 se incorporan 7 átomos más de I radioactivo que con el I-131, es por ello que se marca a una menor actividad específica. Parece ser que los lotes de I-125 suelen ser muy discímiles en cuanto a su pureza y no son completamente "carrier free", lo que determina muchas diferencias de una marcación a otra.

5.— Purificación de la hormona marcada:

El procedimiento más utilizado es la filtración cromatográfica en una columna de gel (Sephadex Pharmacia Fine Chemicals R).

Se usará un tipo diferente de Dextran según el tamaño molecular de la hormona que se quiere purificar. En el caso de la insulina, Yalow y Berson (9) han aprovechado la propiedad que tiene la celulosa de adsorber la insulina, para emplear este medio de purificación.

La finalidad sustancial de la purificación de la hormona marcada reside en la necesidad de quitar todo el yodo no incorporado a la molécula hormonal, así como en retirar completamente la hormona dañada durante el procedimiento de marcación.

6.— Incubación de los antígenos hormonales con el antisuero:

Una vez finalizados los pasos anteriores recién estamos en condiciones de iniciar un experimento, recién contamos con los principales reactivos.

La hormona marcada y el antisuero son puestos a incubar en cantidades y concentraciones constantes y conocidas. La hormona standard se pone en concentraciones diferentes y el suero o plasma problema en una dilución variable entre 1/5 a 1/20 del volumen final del medio de incubación, el cual ciertamente permanecerá siempre constante para cada una de las muestras.

El volumen final de incubación varía entre 0.5 - 4.0 ml., siendo por lo general 1.0 ml. Como medios de incubación se usan diferentes buffers, que varían según el tipo de hormona y procedimiento, del mismo modo difieren el pH y la concentración iónica.

Los buffers más corrientemente utilizados son los de fosfatos, barbita y borato. El pH es siempre alcalino, entre 7.4 y 9.0, la concentración iónica varía entre 0.05 - 0.01 molar.

Aspectos importantes son los que se refieren a la temperatura y tiempo de incubación.

La temperatura más conveniente es 4°C, dado que así el "daño de incubación" de la hormona es menor, sin embargo a esta temperatura el tiempo de incubación es de 3 a 5 días. Hay procedimientos en los que se efectúa la incubación a 37°C y por un período de 2 horas, aunque con el inconveniente anteriormente señalado, puesto que el daño de incubación es directamente proporcional a la temperatura.

7.— Separación de las fracciones libre y unida al anticuerpo.

Este es un paso fundamental para la cuantificación de la hormona que se quiere medir. Se lo efectúa inmediatamente después de concluir el tiempo de incubación.

Aquí las diferentes técnicas tienen una variante esencial, que precisamente da nombre a la técnica. A continuación señalamos las más importantes:

- 1.— Radiocromato-electroforesis; Berson, Yalow, Bawman, Rothschild y Newerly, 1956; Yalow y Berson, 1960 (9), (14).
- 2.— Doble anticuerpo ;Hales y Randle, 1963 (24); Morgan y Lazarow, 1963 (25), (26).
- 3.— Carbón revestido con dextran; Herbert, Lau, Gottlieb y Bleicher, 1965 (27).
- 4.— Precipitación de globulinas por métodos químicos; Grodsky y Forsham, 1960 (28); Odell, Wilber y Paul, 1965 (29).
- 5.— Resinas de intercambio iónico; Meade y Klitgaard, 1962 (30).
- 6.— Adsorción a sílica o talco; Rosselin, Assan, Yalow y Berson, 1966 (31).
- 7.— Método de la fase sólida; Catt, Niall y Tregear, 1966 (32).

En la radiocromatoelectroforesis se aprovecha de la propiedad que tiene la hormona libre de mantenerse en el sitio de aplicación, mientras que

la hormona unida al anticuerpo migra rápidamente hacia el ánodo en un campo eléctrico de alto voltaje.

La incorporación de un suero antigammaglobulina del animal en el que se produjo el antisuero para la hormona a medir, permite en el método del doble anticuerpo precipitar la fracción unida al anticuerpo mientras que la libre permanece en el sobrenadante.

La gamma-globulina puede también ser precipitada por métodos químicos, mediante el uso de soluciones salinas de sulfato de amonio, sulfito de sodio, solución alcohólica de cloruro de sodio o dioxano.

Herbert, Lau, Gottlieb y Bliecher (27) introdujeron una interesante metodología que puede ser empleada no sólo en el dosaje de hormonas proteicas, sino también de esteroides y vitaminas. Las partículas de carbón adsorben las moléculas de hormona libre mientras que el revestimiento de dextrán que las cubre no permite el pasaje del complejo hormona-anticuerpo con mayor peso molecular.

El talco, sílica o resinas de intercambio iónico adsorben únicamente a la libre y la separan así del complejo hormona-anticuerpo.

Catt, Niall y Treager en 1966 (32) pudieron observar que los anticuerpos pueden acoplarse a material inerte tal como los polímeros del estireno, propileno y politetrafluoretileno. Este acoplamiento es de tal naturaleza, que no es fácil de romper por procedimientos comunes. Al aplicar entonces los antígenos en el medio de incubación, la fracción que se liga al antisuero quedará en las paredes del tubo o disco, fabricados con esos polímeros, mientras que la fracción libre puede ser simplemente decantada.

8.— Cuantificación de las fracciones separadas y cómputo de datos:

En la radiocromatoelectroforesis se mide la radiación beta distribuida en las tiras de papel mediante el uso de un integrador. Sin embargo los papeles de electroforesis pueden ser cortados y contados en un contador de pozo. Es necesario tener presente en este método, que únicamente se puede poner sobre el papel de electroforesis no más de 0.2 ml., que constituye una parte de todo el volumen de incubación, lo que significa que la hormona tiene que haber sido marcada a alta actividad específica para dar un número de suficiente de "cuentas" sin mayor incremento de la masa de la hormona marcada y que además permita una adecuada diferenciación de las fracciones.

En cambio, en cualesquiera de los otros métodos se puede medir la radioactividad presente en el volumen total del medio de incubación, generalmente mediante un contador de centelleo con cristal de tipo pozo.

Conocida la cantidad total de radioactividad del medio de incubación, se mide la correspondiente a la hormona unida al anticuerpo. Como factor de corrección es necesario sustraer la radioactividad correspondiente al "daño de incubación", que se ha sumado a la de la hormona unida.

La cantidad de hormona estable presente en el medio de incubación es indirectamente proporcional a la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo y se expresa en forma del índice de hormona unida a hormona libre (B/F ratio, B = bound, F = free) o también considerando únicamente a la fracción unida al anticuerpo y expresándola en porcentaje, donde el 100% constituye aquella fracción denominada blanco y que contiene sólo el antisuero y la hormona marcada, sin que se le haya añadido hormona estable (ver figura N° 1).

Mayores detalles de las técnicas radioinmunológicas se encontrarán en las siguientes secciones, así mismo se recomienda consultar a Berson y col. (33) y Gray y Bacharach (34).

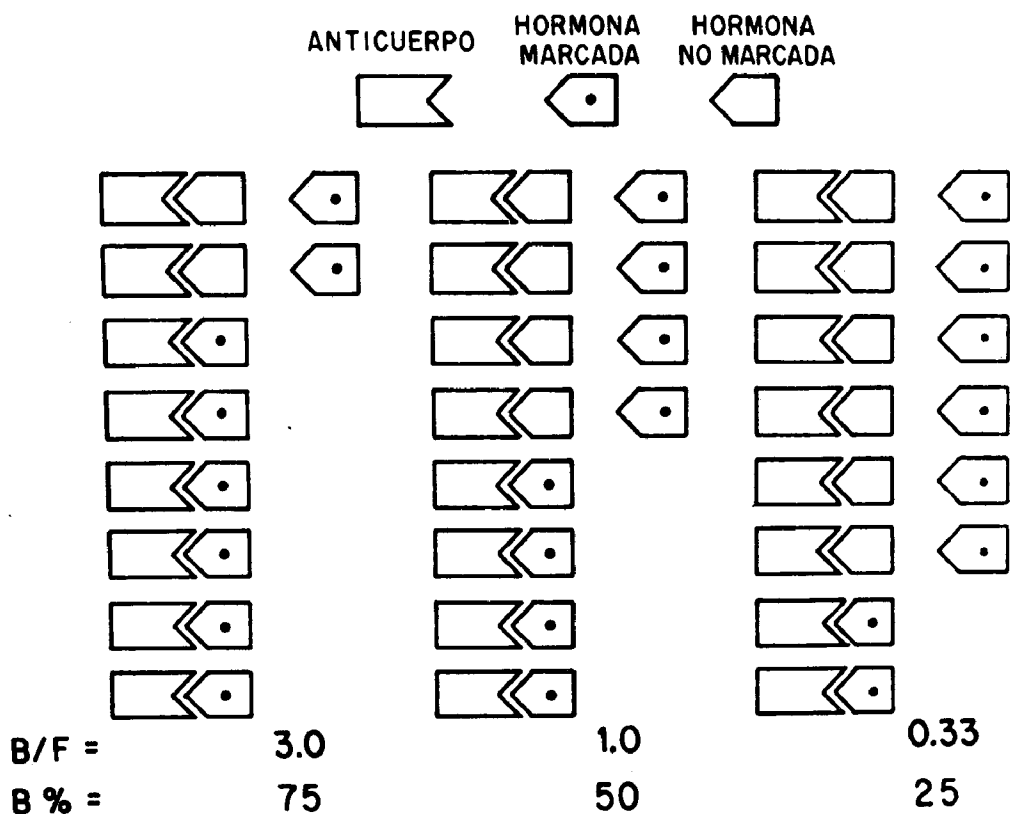


Fig. N° 1.— Proporciones de unión de la hormona marcada y no marcada a los sitios de enlace del antisuero, expresados tanto en la relación B/F (B = bound, unida; F = free, libre), como en porcentaje de hormona marcada unida al anticuerpo (B%).

III. MATERIAL Y METODOS

El material empleado corresponde a 2 tipos de experiencias:

A. Metodología y dinámica del radioinmunoensayo.

B. Aplicación Clínica.

Con el objeto de estudiar aspectos de la dinámica de las técnicas radioinmunológicas se han dosado insulina y hormona del crecimiento.

En el material humano estudiado se ha determinado insulina y hormona luteinizante.

A.— Metodología y dinámica del radioinmunoensayo.

1. Investigación de los factores que intervienen en la marcación de la hormona:

Es experiencia general, incluyendo la nuestra, que factores aún no bien conocidos, influyen esporádicamente en la calidad de los resultados del procedimiento radioinmunológico, sin que medie realmente una causa aparente.

Esto nos indujo a estudiar, bajo la sugerencia y dirección del Dr. Seymour Glick, diversos factores que intervienen en la marcación de la hormona.

Con pequeñas variaciones, que señalaremos oportunamente, hemos marcado las hormonas siguiendo el esquema propuesto por Greenwood, Hunter y Glover (23) con las modificaciones de Yalow y Berson (35):

Buffer de fosfato, pH 7.5, 0.25 M	0.020 ml.
Iodo-131 ó I-125 "carrier free"	1 - 2 mCi
Hormona	5 ug.
Cloramina-T, (350 mg/100 ml.)	0.020 ml.
Metabisulfito de sodio, (240 mg/100 ml.)	0.050 ml.
Albúmina humana al 30%	0.050 ml.

Se han investigado los siguientes factores:

1.1. Condiciones del buffer:

Mediante la medida del pH del buffer utilizado corrientemente y luego usando buffer recientemente preparado.
lécula hormonal:

1.2. Condiciones y origen de la hormona:

- a. Se observó si la hormona de crecimiento almacenada durante largo tiempo podría haber sufrido modificaciones en su estructura molecular, que disminuyen su capacidad inmunológica, comparándola con hormona recientemente diluida y almacenada.

- b. Se comparó la capacidad inmuno reactiva de insulina purificada proveniente de Eli Lilly and Co. (L) y de insulina de los laboratorios del Dr. Mirsky (M).

1.3. Efecto de la cantidad de iodo radioactivo incorporado a la molécula hormonal.

Se marcó insulina con I-131 a actividades específicas de 100 y 1000 mCi/mg.

La hormona marcada a baja (B) y alta (A) actividad específicas fueron purificadas en columnas de celulosa de acuerdo a la técnica ideada por Yalow y Berson (9) obteniéndose cuatro fracciones de cada una de ellas.

Luego de diluir las 8 fracciones, de tal modo que contuvieran la misma cantidad de radioactividad, se dosó su contenido de insulina, empleando para ello como tracer o marcador una preparación de insulina I-125. El protocolo del experimento está delineado en el cuadro N° 2. En este protocolo se ha puesto de ejemplo la fracción B1 (fracción de baja actividad específica N° 1), que se la ha determinado en concentraciones crecientes de 1 a 10.

Esto se ha repetido con las 7 fracciones restantes.

CUADRO N° 2

Muestra	Buffer	Insulina I-125	Insulina standard 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁵ mg.		Antisuero
Control	950	50	—	—	—
Blanco	900	50	—	—	50
.025	875	50	25	—	50
.050	850	50	50	—	50
.100	800	50	100	—	50
.200	700	50	200	—	50
.50	850	50	—	50	50
1.0	800	50	—	100	50
2.0	700	50	—	200	50
Fracción			Insulina I-131		
B1 - 1	850	50	50		50
B1 - 2	800	50	100		50
B1 - 3	750	50	150		50
B1 - 4	700	50	200		50
B1 - 5	650	50	250		50
B1 - 10	400	50	500		50

Las cifras representan el volumen ul

1.4. Efecto de la adición de iodo estable:

En la técnica original de Greenwood, Hunter y Glover (23) se añade iodo estable como "transportador" (carrier). Se quiso establecer si la presencia de cantidades variables de este elemento podría significar algún disturbio, con esta finalidad se realizó un experimento, durante el cual se marcó hormona de crecimiento humana (HCH) con 7 diferentes concentraciones de iodo estable (I-127), agregando una solución de KI en una cantidad tal como para incorporar teóricamente 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 átomos de I-127 por molécula de HCH (ver el protocolo en el Cuadro N° 3).

CUADRO N° 3

	Número de átomos de I-estable por molécula de HCH						
	0	1	2.5	5	10	25	50
Buffer de fosfato, pH 7.5 0.25 M	100	90	75	50	90	75	50
I-131, 1 mCi	—	—	—	—	—	—	—
Sol. KI 2.5×10^{-5} M	—	10	25	50	—	—	—
Sol. KI 2.5×10^{-5} M	—	10	25	50	—	—	—
HCH, (mg/ml.)	5	5	5	5	5	5	5
Cloramina-T, 350 mg/100 ml.	20	20	20	20	20	20	20
Metabisulfito de sodio, 240 mg/100 ml.	50	50	50	50	50	50	50
Albúmina humana al 30%	50	50	50	50	50	50	50
Las cantidades expresan el volumen en ul							

El cálculo matemático está explicado a continuación. Según la constante de Avogadro 1 Mol (molécula gramo) contiene 6.025×10^{23} moléculas de cualquier sustancia.

La solución de KI. 1 M = 166 gr. de KI/lt.
 = 6.025×10^{23} moléculas de KI/lt.
 = 6.025×10^{23} átomos de I-/lt.
 Un ul de KI 1 M = 6.025×10^{17} átomos de I-
 10 ul de KI 10^{-5} M = 6.025×10^{13} átomos de I-
 10 ul de KI 2.5×10^{-5} M = 15.05×10^{13} átomos de I-

Por otra parte:

1 Mol de HCH (PM = 20,000) = 6.025×10^{23} moléculas de HCH
 5 ug de HCH = 15.0625×10^{13} moléculas de HCH.

Por lo tanto teóricamente:

10 ul de una solución de KI, 2.5×10^{-5} M, contiene tanto número de átomos de I-127 como moléculas existen en 5 ug de HCH. En otras palabras en estas proporciones se podría incorporar 1 átomo de I-127 a cada molécula de HCH.

Después de la marcación según el protocolo anteriormente señalado se purificó por separado cada una de las 7 preparaciones de HCH en una columna con sephadex G-75; para esto se llenó una bureta de 100×1.0 cms. con esta sustancia que disuelta en el buffer de Veronal-albúmina forma un gel. La HCH-I-131 se aplicó junto con unos 100 ul de plasma teñido con azul de bromofenol. En un colector automático se fueron recibiendo fracciones de 1.0 ml. Estas fracciones fueron medidas en su contenido de radioactividad en un contador de pozo. La figura N° 2, nos muestra el resultado de la cromatografía, se pueden apreciar claramente dos elevaciones o "picos", el primero de los cuales corresponde al pico orgánico, es decir contiene la hormona marcada. El segundo pico contiene el I-131 libre no incorporado a la hormona. En el pico orgánico están incluidas tanto la hormona dañada en el proceso de marcación, como aquélla que mantiene su capacidad inmunoreactiva. Es conocido que la hormona dañada se une a la proteína plasmática que se añade conformando un complejo de mayor peso molecular (33), es por ésto que aparece en las primeras fracciones y es fácil de diferenciarlas por el color que les confiere el azul de bromofenol. Para el uso ulterior en el procedimiento radioinmunológico se separan los tubos siguientes, que ya no muestran el color azul.

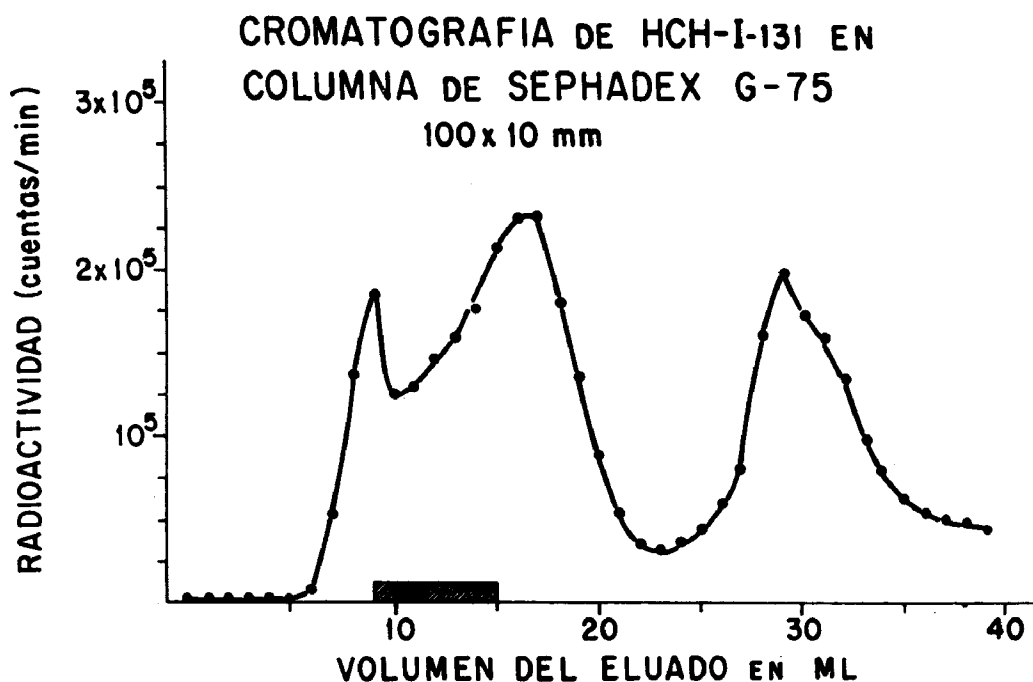


Fig. N° 2.— Purificación de hormona de crecimiento humana marcada con I-131 en una columna de Sephadex G-75. Las fracciones teñidas con el plasma-azul de bromofenol están representadas por la barra horizontal. La radioactividad presente en las fracciones 5 hasta la 23 corresponden al "pico orgánico"; del 23 a la 40 representan el "pico inorgánico" de I-131. En este caso se escogió la fracción N° 17 como la más conveniente.

Se escogieron 4 fracciones de cada preparación principal. Cada una de las cuales fue incubada con suero anti-HCH a 2 diferentes diluciones 1/500,000 y 1/2'000,000 en buffer de veronal-albúmina pH 8.6 0.05 M y a temperatura ambiente durante 24 horas, después de poner homogeneamente 7,300 cpm/50 ul. Se efectuó una electroforesis a alto voltaje y scanning de las tiras de papel.

Posteriormente se cortó las tiras y se midió la radioactividad correspondiente a las fracciones libre y unida en un contador de pozo automático marca Picker.

1.5. Efecto del tiempo de marcación:

El paso más importante de la incorporación de iodo corresponde a la oxidación determinada por la Cloramina —T.

Debe ser relativamente rápido, aunque depende del uso de I-131 ó I-125, con este último se ha recomendado tiempos más prolongados. Por lo general se emplea 15" - 30" de oxidación con la cloramina —T antes de añadir el metabisulfito de sodio en exceso con el objeto de parar la reacción.

Se marcó una preparación en la forma habitual y otra aplicando la cloramina —T durante 1'30". Se efectuó la purificación en la forma habitual separándose 3 fracciones de cada preparación para su comparación. Incubación con el antisuero a dos diluciones 1/500,000 y 1/2'000,000 como el experimento anterior y por último radiocromatoelectroforesis en papel.

2. Comparación de los métodos de separación de la hormona unida de la hormona libre.

Hemos tenido oportunidad de comparar cuatro métodos:

- a. Radiocromato electroforesis.
- b. Empleo de doble anticuerpo.
- c. Carbón revestido con dextran.
- d. Precipitación de globulinas por medios químicos, mediante el empleo de una solución saturada de sulfato de amonio.

La comparación no se refiere tanto a la sensibilidad o eficiencia de cada uno de estos métodos, sino a su factibilidad de realizarlos en nuestro medio, dado que no han sido comparados simultáneamente; así mismo su descripción permitirá al lector conocer mayores detalles de cada uno de estos métodos.

2.1. Radiocromato electroforesis

El protocolo del experimento ilustra los aspectos más importantes de esta técnica (ver Cuadro N° 4).

Diluyente BVA: Buffer de veronal - Albúmina, contiene Veronal (barbital y barbital sódico) 0.025 M, pH 8.6, con 0.3 gr.% de albúmina humana (Pentex, Inc. Kankakee, 111).

Solución Standard de Insulina: se prepara cada 6 meses una solución madre de insulina humana conteniendo 1 mg/ml., la cual se almacena en pequeñas cantidades a -20°C . Esta solución madre se diluye luego con el mismo buffer de tal modo que contenga 2.5 mug/ml.

Insulina-I-131: luego de la marcación y purificación, se diluye con el mismo buffer de tal modo que tenga un número suficiente de "cuentas" en una pequeña masa, en el orden de 0.5 mug/ml.

Antisuero: se empleó antisuero obtenido en cobayo y disuelto 1: 25,000.

CUADRO N° 4

Muestra N°	Diluyente BVA ul	Insulina I-131 ul	Insulina Standard 2.5 mug/ml.	Antisuero Antiin- sulina de cerdo 1:25,000 ul
Blanco 1	400	50	0	50
Blanco 2	400	50	0	50
1	395	50	5 (.025)	50
2	390	50	10 (.050)	50
3	380	50	20 (.100)	50
4	370	50	30 (.150)	50
5	360	50	40 (.200)	50
6	340	50	60 (.300)	50
7	320	50	80 (.400)	50
8	300	50	100 (.50)	50
9	250	50	150 (.75)	50
10	200	50	200 (1.0)	50
11	100	50	300 (1.5)	50
12	0	50	400 (2.0)	50
Control	450	50	—	—

Los números en paréntesis señalan la cantidad de insulina en milimicrogramos.

El blanco no tiene standard y el control únicamente contiene el diluyente y la hormona marcada, esto último con el objeto de conocer el daño de incubación.

Después de agitar en tubos plásticos, descartables, de 10×75 mm. se pasó a incubar a 4°C durante 5 días.

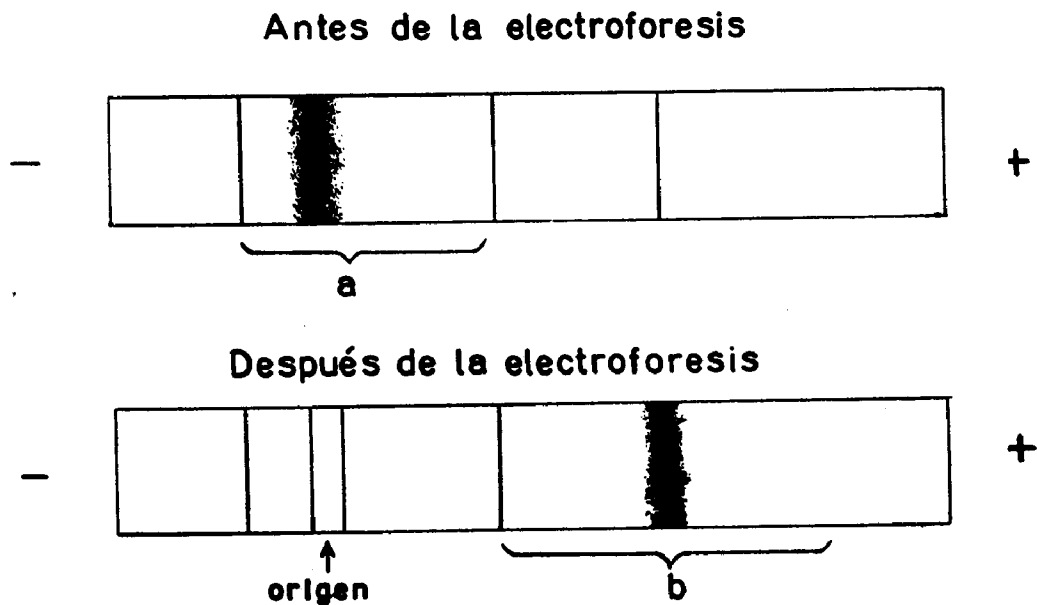


Fig. N° 3.— La electroforesis ha separado la fracción libre inalterada que no ha migrado (segmento a) de la fracción unida al anticuerpo o dañada durante el proceso de marcación, las que en uno u otro caso han migrado con el plasma teñido con azul de bromofenol (segmento b).

Al finalizar este tiempo, se efectuó una electroforesis en papel Whatman 5 MM a 600 voltios y 300 miliamperios en un aparato marca Kepco modelo 615 B, instalado en un cuarto frío a 4°C. Con este objeto se mezcló 200 ul del incubado con 50 ul de plasma teñido con azul de bromofenol y aplicó al sitio inicial u "origen" de la electroforesis de tipo horizontal.

Aproximadamente después de 7 horas se logró una separación adecuada (9 cms.).

Una vez que las tiras fueron secadas en una estufa se las pegó por sus extremos y fueron colocadas en un Scanner (para determinar gráficamente la distribución del isótopo, en este caso aprovechando la acción de su radiación beta. Se tenía a disposición un Scanner marca Baird Atomic y otro marca Packard).

Las tiras pueden también ser cortadas en los fragmentos (a) y (b) como se señala en la figura N° 3. La porción (a) contiene la hormona libre que se ha quedado en el origen, mientras que la porción (b) contiene la hormona unida al anticuerpo que ha migrado junto al plasma teñido con azul de bromofenol. (Ver figuras 4 y 5).

Estas 2 porciones fueron puestas en tubos en un contador automático de centelleo tipo pozo (Picker Nuclear Autowell II).

CURVA STANDARD DE INSULINA

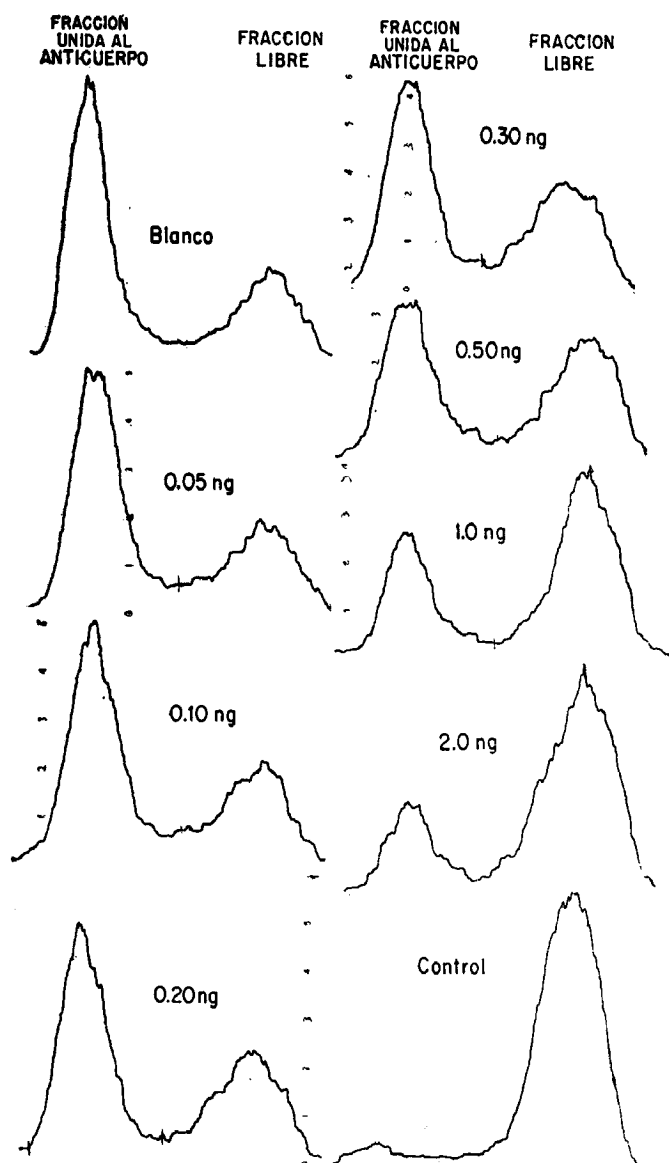


Fig. N° 4.—Variación de la proporción de hormona unida al anticuerpo y de hormona libre correspondiente a una curva standard después de una radiocromato electroforesis.

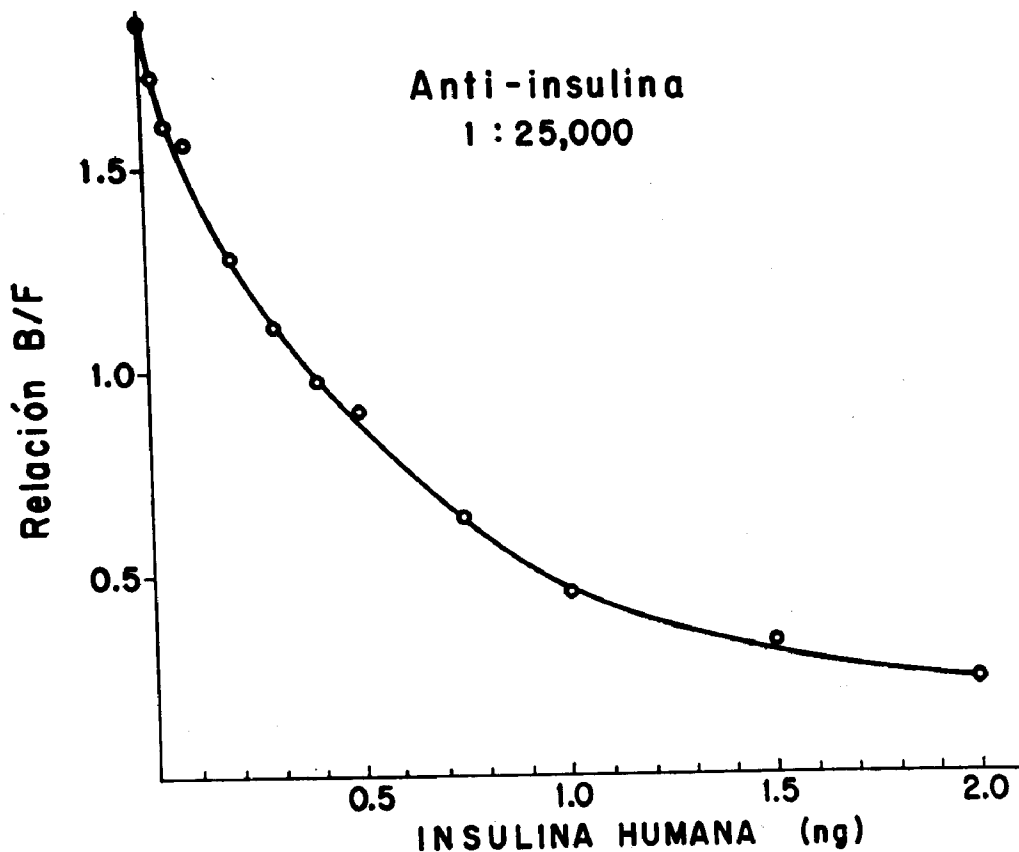


Fig. N° 5.— Curva standard de insulina.

2.2. Método del carbón revestido con dextran:

Se utilizaron los siguientes componentes:

Insulina standard: insulina de cerdo purificada (Dra. Mary Root, Eli Lilly Indianapolis), con una actividad de 23.9 UI/mg., contiene 0.016% de glucagon.

Insulina —I-125: la hormona anterior se marcó con I-125 “carrier free” (Unión Carbide Corp.) a una actividad entre 40 - 80 mCi/mg. según el método de Greenwood, Hunter y Glover (23), con las modificaciones de Yalow y Berson (35).

La insulina marcada se purificó mediante el uso de una columna de celulosa. Se llena con celulosa 2 cms. de una pipeta serológica de 5 ml.,

después de poner lana de vidrio en la punta. Se lava la columna con buffer sin proteína. Se aplica la insulina marcada y luego se vuelve a lavar con lo que se descarta el I-131 libre. Se aplican 5 porciones de 1 ml. de plasma humano (obtenido en ayunas de persona normal) tratado con iodo acetamida el 0.5%. Por lo general en las 2 primeras fracciones se elimina la insulina radioactiva dañada durante la marcación y a partir de la 3ª fracción se obtendrá insulina adecuadamente purificada.

Esto se puede comprobar a través de una radiocromatoelectroforesis.

Suero anti-insulina de cerdo: obtenido comercialmente de Pentex, cuya titulación permitió establecer un B/F radio 1.0 - 1.7 a diluciones entre 1:10,000 a 1:25,000. El Cuadro Nº 5, muestra los detalles del experimento para este tipo de método, que fue modificado del original (27) únicamente en los volúmenes de los componentes.

Diluyente: buffer de veronal-acetato pH 7.4, que se prepara de la siguiente manera: 100 ml. de solución concentrada de veronal-acetato (barbital sódico 14.714 gr., acetato de sodio 9.714 gr., agua destilada 500 ml.) se mezclan con 1,800 ml. de cloruro de sodio al 0.85% y ácido clorhídrico 0.1 N en cantidad suficiente para obtener un pH 7.4.

Suspensión de carbón:

Carbón (Norit Amend Drug and Chemical Co.) 5 gr.

Buffer diluido 100 ml.

Suspensión de dextran:

Dextran 70 (Pharmacia Fine Chemicals) 0.5 mg.

Buffer veronal-acetato diluido 100 ml.

Suspensión de carbón-dextran:

Se mezclan volúmenes iguales de las suspensiones de carbón y dextran. Se almacena a 4°C hasta por un mes sin cambio de su actividad.

Buffer de veronal-acetato-albúmina: se obtiene mediante la adición de 350 mg. de albúmina humana (Pentex) por cada 100 ml. de buffer:

Los autores recomiendan el uso de Albumisol (Merck Sharp and Dohme).

CUADRO Nº 5

	Buffer Veronal Acetato Albúmina pH 7.4 ml.	Insulina I-125 ml.	Insulina Standard 0.025-2 ng o problema ml.	Suero Anti- insulina Pentex 1:25,000 ml.
Blanco	1.6	0.2	—	0.2
Standard o Problema	1.4	0.2	0.2	0.2
Control	1.8	0.2	—	—

Se incubaba a 37°C durante 2 hs. Adición de 1 ml. de suspensión de carbón-Dextran. Agitar 10". Contrifugación a 2,000 rpm/20'. La radioactividad del sedimento corresponde a hormona libre.

2.3. Método del doble anticuerpo:

Diluyente: buffer de borato

Acido bórico 8.25 gr.

Hidróxido de sodio 2.70 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Merthiolate o ácida de sodio 0.1 gr.

Albúmina humana al 30% 10 ml.

Acido clorhídrico 12N c.s.p. obtener un pH 8.5.

Insulina-I-125 :se marcó y purificó insulina de cerdo en igual forma a lo señalado para el método anterior.

Standard de insulina humana: para los experimentos de aplicación clínica se utilizó como standard insulina de origen humano con una actividad de 26.9 U/mg.

Suero antinsulina: se empleó una preparación comercial (Pentex) diluida, previa titulación, a 1:60,000.

Suero antigammaglobulina de cobayo: se usó una preparación comercial (Antibodies Incorporated) diluida, previa titulación, 1:12 a 1:24.

Solución de EDTA: se preparó una solución 0.1 M de EDTA en buffer de borato con albúmina al 0.3% pH 8.5. (En el cuadro N° 6 se muestra el protocolo del experimento).

CUADRO N° 6

	Buffer borato albúmina pH 8.5 ml.	EDTA 0.1 M ml.	Insulina I-125 ml.	Insulina Standard o Problema ml.	Suero anti- insulina ml.
Blanco	0.7	0.1	0.1	—	0.1
Standard o					
Problema	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1
Control	0.8	0.1	0.1	—	—

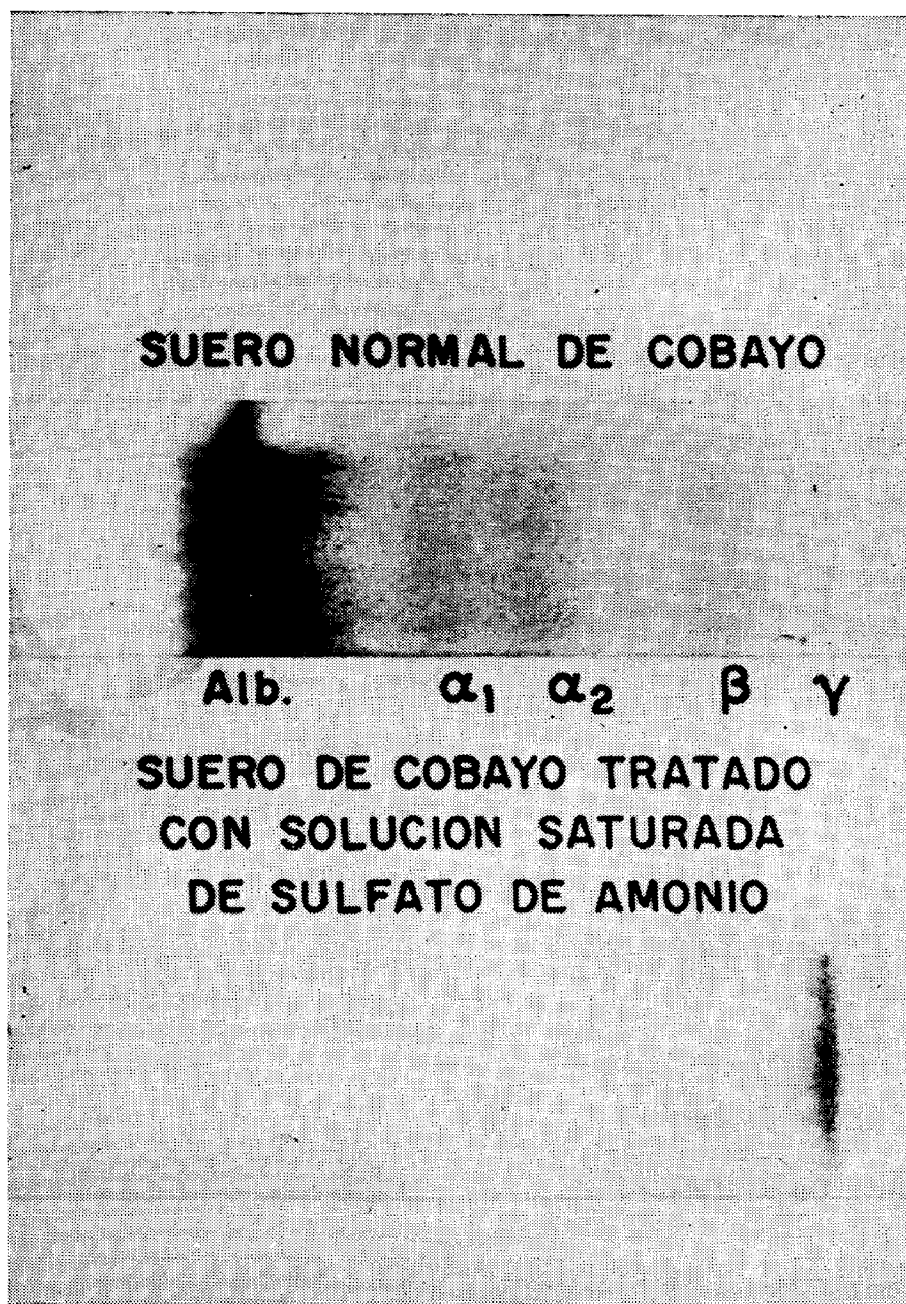


Fig. Nº 6.— La precipitación de proteínas por el método de Kjeldahl ha permitido una buena separación de las gammaglobulinas.

Incubación durante 5 días a 4°C. Adición de 0.1 ml. de suero normal de cobayo diluido al 1:100 en buffer de borato. Adición de 0.1 ml. de suero anti-gammaglobulina de cobayo. Incubación durante 24 hs. a 4°C.

Centrifugación a 2,000 rpm/20'.

2.4. Método de precipitación con sulfato de amonio:

El método de Kjeldahl de separación de proteínas plasmáticas permite la precipitación de las globulinas mediante el uso de una solución saturada de sulfato de amonio. Conociendo que los anticuerpos se hallan en la fracción globulínica del plasma, podemos precipitar la fracción de hormona unida al anticuerpo por el uso de este procedimiento.

La figura N° 6 muestra los resultados de la electroforesis en papel tanto del suero total como de la globulina de cobayo precipitada y redisoluelta por el método de Kjeldahl.

Diluyente: similar el utilizado para el método de carbón-dextran así como la insulina —I-125, insulina standard y antisuero (El cuadro N° 7 muestra el protocolo del experimento).

CUADRO N° 7

	Buffer Veronal Acetato Albúmina pH 7.4 ml.	Insulina I-125 ml.	Insulina Standard o problema ml.	Suero Anti- insulina Pentex 1:10,000 ml.
Standard	0.7	0.1	0.1	0.1
Problema	0.6	0.1	0.2	0.1
Control	0.9	0.1	—	—

Incubación a 4°C durante 5 días. Adición de 0.2 ml. de suero normal de cobayo. Adición de 0.6 ml. de solución saturada de sulfato de amonio. Contrifugación de 2,000 rpm/20'. El precipitado corresponde a hormona unida al anticuerpo.

B.— Aplicación Clínica:

1. Dosaje de insulina:

Se ha dosado insulina por duplicado a 24 sujetos normales, naturales y residentes del nivel del mar y 23 residentes naturales de altura (La Oroya, 3,730 mts.), todos del sexo masculino, a quienes se realizó un test standard de tolerancia de la glucosa.

La insulina fue dosada por el método del doble anticuerpo de Morgan y Lazarow (25), (26) con pequeñas modificaciones, tal como está especificado en 2.3. Método del doble anticuerpo.

Test de tolerancia de la glucosa:

Se obtuvo muestras basales y luego de 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la administración de 1.75 grs. de glucosa por kg. de peso por vía oral. La glicemia fue determinada por el método de Somogyi-Nelson (36), (37), (38).

2. Dosaje de hormona luteinizante (LH):

Se ha determinado la concentración sérica o plasmática de hormona luteinizante (LH) en los siguientes grupos de personas:

2.1. Mujeres normales controles:

A 21 mujeres normales la mayoría de probada fertilidad, sin tratamiento hormonal, únicamente 6 con implantación de un dispositivo intrauterino (DIU, asa de Lippes) se estudió obteniendo muestras diarias entre el 10° y 20° días del ciclo menstrual e interdiario en el resto del ciclo. En 10 de ellas el muestreo fue cotidiano durante un mes.

2.2. Mujeres bajo tratamiento con enantato de Noretindrona:

En 19 mujeres normales, todas fértiles, se estudió durante 22 ciclos menstruales el efecto del enantato de noretindrona, 200 mgrs. por vía intramuscular, sobre la producción de LH. Este compuesto es un anticonceptivo de depósito, cuyo efecto dura tres meses. En este grupo el estudio también fue lineal, a lo largo del ciclo menstrual. Dieciséis ciclos se estudió en el primer mes, 3 en el segundo y 3 en el tercer mes. En un caso se obtuvo muestras diarias durante los tres meses.

2.3. Mujeres tratadas con D-Norgestrel:

A 10 mujeres normales, probadamente fértiles, se midió LH en sangre a lo largo del ciclo menstrual mientras estuvieron recibiendo 30 microgramos de D-Norgestrel en un esquema de tratamiento anticonceptivo oral continuo.

2.4. Mujeres tratadas con acetato de Noretindrona:

El mismo estudio que en los grupos anteriores se efectuó a tres mujeres durante el tiempo en que recibieron tratamiento oral continuo con acetato de Noretindrona (0.3 mg. diarios, en dosis oral continua).

2.5. Mujeres menopáusicas:

Se han obtenido muestras simples a cinco mujeres menopáusicas.

2.6. Mujeres con insuficiencia ovárica primaria:

Dos pacientes fenotípicamente femeninas, con amenorrea primaria, ausencia de caracteres sexuales secundarios, de corta estatura, cuello corto, implantación baja de cuero cabelludo, cromatina sexual nuclear negativa, gonadotrofinas hipofisarias determinadas por el método biológico de Albert (39) muy elevadas, fueron considerados como portadores de un síndrome de Turner (40).

2.7. Mujer con insuficiencia ovárica secundaria:

Una paciente, que presentó un cuadro de panhipopuitarismo después de parto laborioso con hemorragia y shock, considerada como portadora de un síndrome de Sheehan (41) fue estudiada muchos años después, cuando su edad correspondía a una mujer menopáusica.

2.8. Hombres normales de nivel del mar:

A 70 hombres normales, nativos de la costa y resistentes de Lima (150 mts. sobre el nivel mar) de 20 a 40 años, se obtuvo una muestra entre 8 a 10 a.m.

2.9. Hombres normales de altura:

A 44 hombres normales nativos de altura y residentes de Morococha (4,540 mts. sobre el nivel del mar), de edad similar a la del grupo anterior, se obtuvo una muestra de sangre entre 8 a 10 a.m.

2.10. Hombres con insuficiencia testicular primaria:

Tres pacientes correspondientes a un síndrome de Klinefelter (42), tanto clínicamente como por la determinación de cromatina sexual nuclear, espermatograma y gonadotrofinas urinarias.

2.11. Hombres con insuficiencia testicular secundaria:

A este grupo pertenecen 4 pacientes con cuadro inequívoco de hipogonadismo, proporciones eunucoides, ausencia de caracteres sexuales secundarios y gonadotrofinas urinarias negativas (determinadas por el método biológico de Albert). Uno de estos pacientes corresponde al síndrome de Kallman (hipogonadismo hipogonadotrófico con anosmia).

Técnica de determinación de hormona luteinizante:

Método de Odell, Ross y Rayford (11).

Diluyente: buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.8 contiene además Merthiolate o azida de sodio al 1:10,000, 0.9 gr.% de cloruro de sodio y albúmina humana o bovina al 0.6%.

Solución de EDTA: 0.1 M, pH 7.6, en el buffer anterior.

LH-I-125: se obtuvo LH purificada del laboratorio de la Dra. Anne S. Hartree (Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge) la cual se marcó con I-125 Unión Carbide Corp., Tuxedo N.Y.).

Solución standard: se utilizó el 2º IRP (Second International Reference Preparete; cada ampolleta contiene 40 UI de LH y 40 UI de FSH).

El contenido de una ampolleta del 2º IRP se diluye en 16 ml. del buffer de fosfatos con albúmina; esto constituye la solución stock, que contiene 2,500 mUI/ml de LH.

Solución standard A: se diluye al 1/10 la solución stock (250 mU/ml).

Solución standard B: se diluye al 1/10 la solución standard A (25 mU/ml).

Solución standard C: se obtiene diluyendo al 1/10 la solución standard C (2.5 mU/ml).

Suero anti-HCG (suero anti-hormona coriónica gonadotrófica humana):

Se ha utilizado un preparado obtenido en la Fundación Worcester (Shrewsbury Massachusetts, USA) cuya especificidad ha sido determinada previamente (43).

Este antisuero, que se dice contiene el 1º anticuerpo, se tituló de acuerdo al protocolo presentado en el cuadro Nº 8.

CUADRO Nº 8

	Buffer Fosfato Albúmina ul	LH-I-125 ul	EDTA ul	Suero Anti-HCG ul	Dilución
Control	800	100	100	—	
1	700	100	100	100	10 ⁻³
2	700	100	100	100	10 ⁻⁴ _i
3	700	100	100	100	4 × 10 ⁻⁴
4	700	100	100	100	5 × 10 ⁻⁴
5	700	100	100	100	6 × 10 ⁻⁴
6	700	100	100	100	7 × 10 ⁻⁴

Incubación a 4°C durante 4 días. Después de este tiempo se agregó 100 ul de suero normal de conejo al 1% y 100 ul de antisuero anti-gammaglobulina de conejo diluido a 1/12. Segunda incubación durante 24 hs. a 4°C. Se contó la radioactividad total del tubo. Se contrifugó a 2,000 rpm. en centrifuga refrigerada durante 20 minutos. El contenido del tubo se decanta y se vuelve a contar el precipitado.

De acuerdo a los resultados de este experimento que se presentan en la sección correspondiente se escogió el suero a una dilución de 1:60,000.

Suero anti-gammaglobulina de conejo:

Se empleó una preparación comercial, proveniente de Antibodies Incorporated (Davis, California), cuya capacidad se tituló de acuerdo al protocolo descrito en el Cuadro N° 9. Este suero contiene lo que convencionalmente se conoce como el 2º anticuerpo (de esto proviene la denominación de técnica del doble anticuerpo).

CUADRO N° 9

	Dilución del suero anti-gamma glo- bulina de conejo	Buffer Fosfato Albúmina ul	EDTA ul	LH-I-125 ul	Suero Anti-HCG al 10 ⁻³
1	1/2	700	100	100	100
2	1/4	700	100	100	100
3	1/8	700	100	100	100
4	1/16	700	100	100	100
5	1/24	700	100	100	100
6	1/32	700	100	100	100

Después de incubar durante 4 días a 4°C la hormona marcada con el suero anti-HCG diluido únicamente a 1:1,000, se agrega 100 ul de suero normal de conejo al 1% y 100 ul del suero anti-gammaglobulina de conejo en las diluciones señaladas en este cuadro. Se vuelve a incubar por 24 hs. a 4°C. Se cuenta la radioactividad total del tubo. Se centrifuga a 2,000 rpm. Se decanta el sobrenadante. Se cuenta la radioactividad del precipitado.

De acuerdo a los resultados obtenidos y que se consignan en la sección respectiva, se escogió el suero anti-gammaglobulina de conejo a una dilución al 1:12.

Una vez que se han obtenido los diferentes reactantes se formula el protocolo de la determinación de LH en el suero o plasma de acuerdo al protocolo consignado en el Cuadro N° 10, en el también se puede apreciar la constitución de la curva standard.

Protocolo de la determinación radioinmunológica de LH:

CUADRO N° 10.

	Buffer fosfatos pH 7.8 ml.	EDTA ml.	LH-I-125 ml.	Standard 2do. IRP ml. cantidad	Suero Anti- HCG 1:60,000 ml.
Control	0.8	0.1	0.1	0	0
Blanco	0.7	0.1	0.1	0	0.1
Solución St. A	0.3	0.1	0.1	0.4 (100 mU)	0.1
"	0.5	0.1	0.1	0.2 (50 mU)	0.1
"	0.6	0.1	0.1	0.1 (25 mU)	0.1
Solución St. B	0.3	0.1	0.1	0.4 (10 mU)	0.1
"	0.5	0.1	0.1	0.2 (5 mU)	0.1
"	0.6	0.1	0.1	0.1 (2.5 mU)	0.1
Solución St. C	0.3	0.1	0.1	0.4 (1.0 mU)	0.1
"	0.5	0.1	0.1	0.2 (0.5 mU)	0.1
"	0.6	0.1	0.1	0.1 (0.25 mU)	0.1
				Suero o plasma	
Problema	0.5	0.1	0.1	0.2	0.1

Incubación a 4°C durante 4 días. Se agrega 0.1 ml. de suero normal de conejo al 1% y 0.1 ml. de suero anti-gammaglobulina de conejo al 1:12.

Segunda incubación por 24 hs. a 4°C. Se cuenta la radioactividad total del tubo. Contrifugación a 2,000 rpm/20'. Se decanta el sobrenadante y se cuenta la radioactividad presente en el precipitado, que contiene la hormona ligada al anticuerpo.

El número de cuentas del precipitado del blanco se acepta como 100% y luego se establece porcentualmente el precipitado de cada uno de los puntos de la curva standard, graficándose la concentración en relación logarítmica y el porcentaje de precipitación en relación simple o aritmética.

La gráfica N° 7 muestra una curva standard de LH.

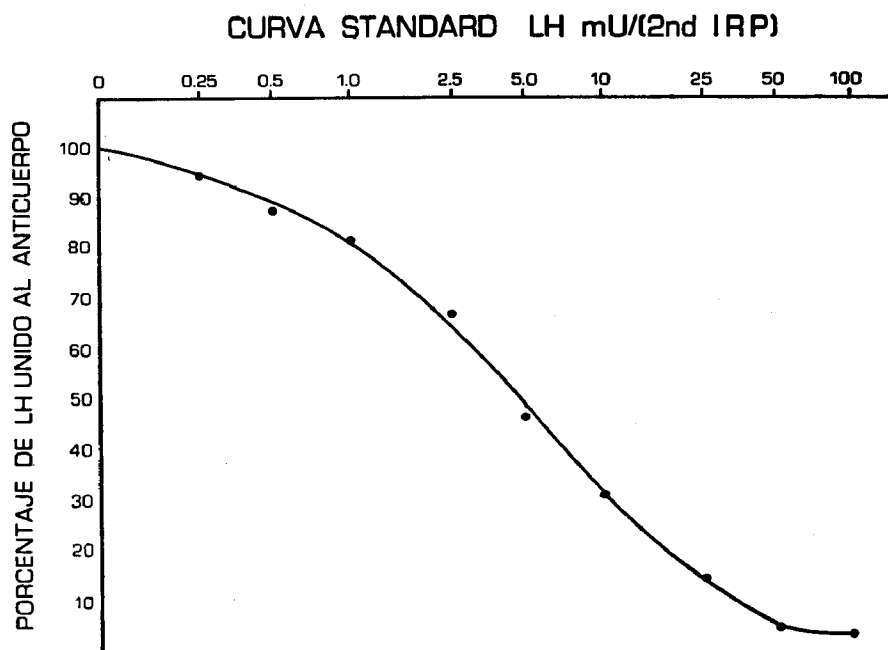


Fig. N° 7.— Curva standard de hormona luteinizante.

IV. RESULTADOS

Aquí se seguirá el mismo numeral que se ha puesto a la presentación en el capítulo anterior.

A.— Metodología y dinámica del radioinmunoensayo:

1. Investigación de los factores que intervienen en la marcación de la hormona:

1.1. Condiciones del buffer de marcación:

Según el método original (23) el buffer de fosfatos debe ser 0.25 M a un pH 7.5. Después de preparado, se suele mantener el buffer a las condiciones del medio ambiente, lo cual por cierto puede alterar las condiciones del mismo, especialmente su pH.

En este sentido se pudo verificar que efectivamente el pH del buffer estaba en 7.0.

Las marcaciones de insulina y hormona de crecimiento antes de usar un buffer recientemente preparado varió entre 65% a 72% en repetidas oportunidades. Con el buffer adecuadamente titulado las marcaciones estuvieron entre 80% a 90% de efectividad. Por otra parte se pudo apreciar un menor daño de marcación.

Esto nos lleva a recomendar la preparación de pequeñas cantidades de buffer de marcación, el cual deberá ser almacenado a 4°C y por poco tiempo para conseguir una marcación óptima.

1.2. Condiciones y origen de la hormona:

El Cuadro Nº 11 muestra que la hormona “nueva” tuvo una mejor capacidad de unirse con el anticuerpo, que la hormona largamente almacenada como lo demuestran los valores más altos de la relación B/F.

CUADRO Nº 11

Clase de hormona	Nueva				Vieja	
Fracción examinada	3	6	9	2	5	8
Antisuero diluido a 5×10^{-5}	5.06	3.77	3.77	2.18	2.70	1.59
Antisuero diluido a 2×10^{-6}	0.42	0.62	0.58	0.44	0.43	0.47

Lo que hace ver que el almacenaje prolongado, pese a efectuarse por debajo de -20°C puede tener efecto nocivo sobre la hormona, por lo me-

nos en cuanto a su capacidad para unirse al anticuerpo correspondiente y en las condiciones experimentales expuestas.

Las diferencias entre la insulina de Mirsky y la de Eli Lilly fueron muy pequeñas, más atribuibles a factores técnicos que a las mismas hormonas, como se puede observar en la similitud de curvas standard obtenidas con ambas preparaciones (ver gráfica N° 8.).

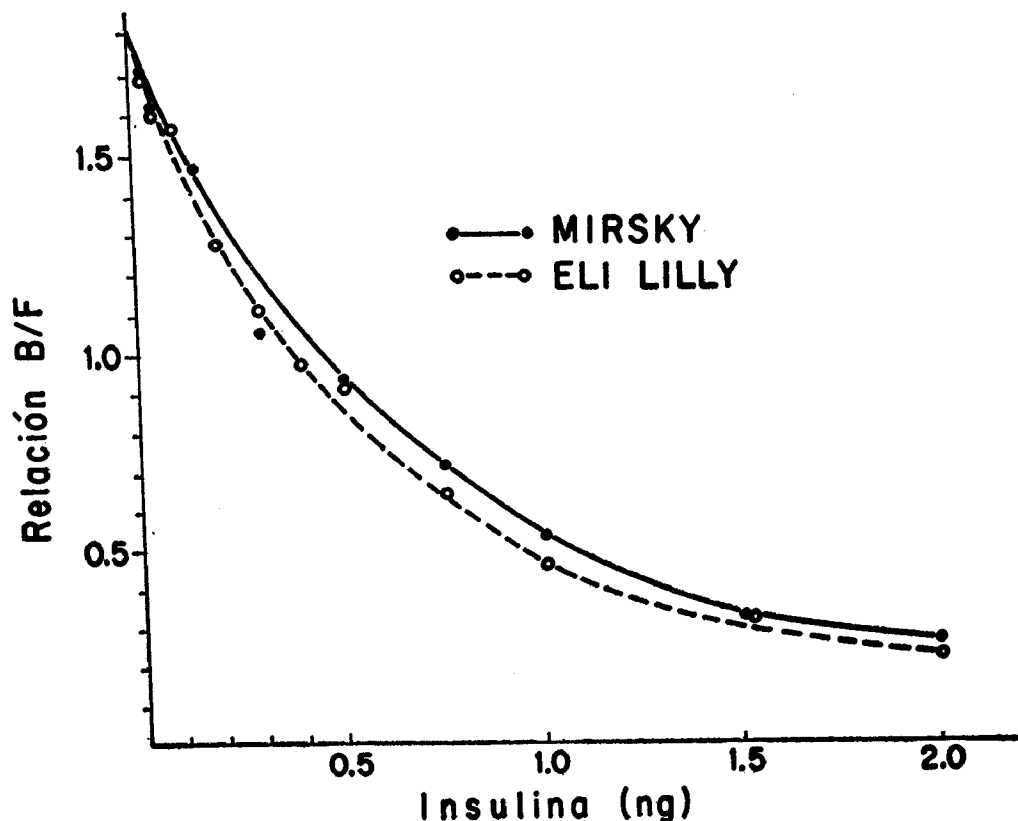


Fig. N° 8.— Las insulinas de dos orígenes han permitido la obtención de curvas standard superponibles.

1.3. Efecto de la cantidad de yodo radioactivo incorporado a la molécula hormonal.

1.3.1. El cuadro N° 12 y la gráfica N° 9 ilustran el efecto de la marcación de insulina a dos diferentes actividades específicas, 100 y 1,000 mCi de I-131/mg. respectivamente. La gráfica representa los valores promedio de las diferentes fracciones estudiadas.

En experimentos más cortos hemos buscado el efecto de la diferente incorporación de radioactividad a la molécula hormonal, marcando insuli-

na con I-131 a actividades específicas de 12 y 300 mCi/mg.; hormona de crecimiento con I-125 a actividades de 25 y 50 mCi, con I-131 a actividades de 130, 700 y 1,000 mCi/mg sin haber hallado ninguna diferencia por la cantidad ni por el tipo de isótopo empleado.

CUADRO N° 12

Concentración del Tracer	B1	B2	B3	Fracciones				
				B4 Insulina (ng)	A1	A2	A3	A4
1	.19	—	.17	.22	.04	.0	.07	—
2	.42	.59	.38	.49	.07	.08	.07	.06
3	.67	.60	.60	.67	—	.11	.08	.13
4	.85	.72	.78	.86	.09	—	.12	.09
5	.95	.97	—	1.2	.11	.11	.12	.12
10	2.2	2.05	—	2.3	—	.21	.21	.20

B = baja; A = alta (actividad específica).

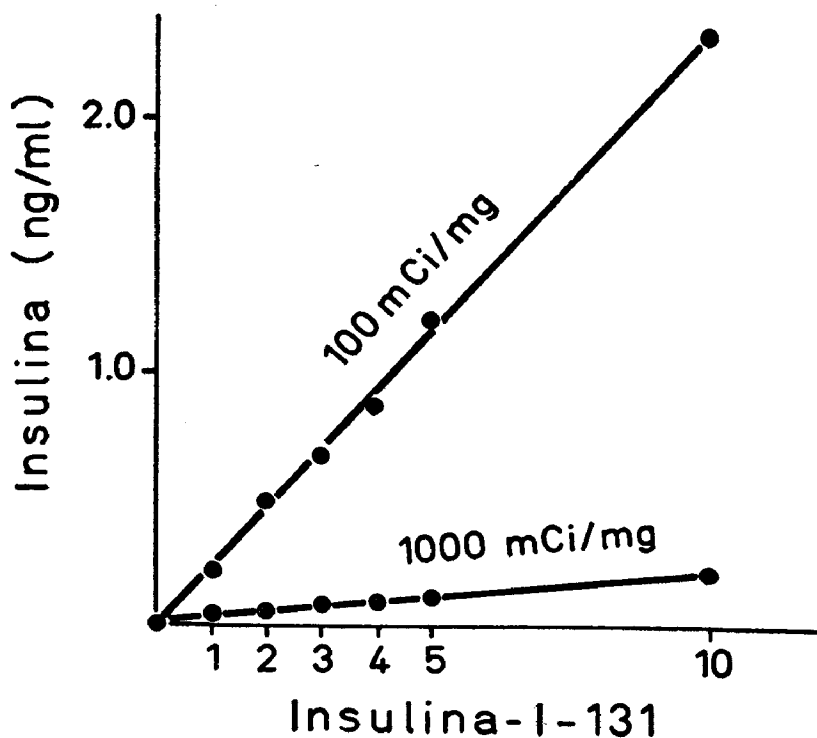


Fig. N° 9.— Comparación de las masas de insulina existentes en dos preparaciones marcadas a dos diferentes actividades específicas.

1.4. Efecto de la adición de iodo estable:

Es indudable que la presencia o contaminación con iodo de otra calidad, que no sea el usado para la determinación radioinmunológica, es negativa para el proceso de marcación.

Como se puede ver en el Cuadro Nº 13 la eficiencia de la marcación con el isótopo radioactivo se altera a partir de la incorporación de 5 átomos de I-127 por molécula de HCH.

CUADRO Nº 13

Variación de la eficiencia de marcación debida a la incorporación de I-127 a la molécula de hormona de crecimiento (expresada porcentualmente).

Nº de átomos I-127/molécula de HCH	Hormona bien marcada	Hormona marcada dañada	I-131 libre	Eficiencia Marcación
0	47.49	27.34	25.17	74.83
1	62.35	15.17	22.50	77.50
2.5	66.66	12.50	20.84	79.16
5	54.54	13.63	31.83	68.17
10	48.64	13.51	37.85	62.15
25	23.67	4.47	71.86	28.14
50	14.45	6.02	79.53	20.47

Este fenómeno se ha producido ciertamente por el hecho de que el I-127 ha sido incorporado a la molécula desplazando al I-131, es decir que a mayor concentración de I-127, cada molécula de HCH posee menor número de átomos radioactivos, es de menor actividad específica.

Este efecto negativo del I-127 se apreció también claramente cuando cada una de estas preparaciones, después de su respectiva purificación, se puso en contacto con el suero anti-HCH.

Como se puede apreciar en el Cuadro Nº 14, en el cual los resultados se expresan en la relación B/F nuevamente las preparaciones con menos de 5 átomos de I-125 por molécula tienen una mejor capacidad de unirse al anticuerpo. Aquí también puede deberse a que al nivelar todas las preparaciones a un mismo número de cuentas o sea con una igual cantidad de radioactividad por tubo, ha sido necesario poner mayor cantidad de HCH-I-131 a medida que la actividad específica de cada preparación ha ido disminuyendo.

CUADRO N° 14

N° de átomos I-127/molécula de HCH	Fracción de HCH-I-131 purificada	Antsuero diluido a 5×10^{-5}	Antisuero diluido a 2×10^{-6}
0	5	1.249	0.466
	8	1.062	0.416
	12	0.28	0.518
	15	0.465 .901	0.345 .436
1	6	0.981	0.291
	9	0.936	0.452
	12	0.921	0.521
	15	1.199 .714	0.405 .416
2.5	5	1.109	0.487
	8	1.224	0.281
	12	1.234	0.419
	16	0.986 1.138	0.638 .456
5	6	1.102	0.377
	9	0.969	0.281
	12	1.760	0.493
	15	1.189 1.255	0.327 .409
10	6	1.406	0.374
	9	1.393	0.411
	12	0.713	0.306
	15	0.350 .965	0.327 .354
25	6	0.581	0.229
	9	0.901	0.157
	12	0.991	0.247
	15	0.543 .804	0.317 .237
	6	0.582	0.101
	9	0.659	0.095
	12	0.590	0.177
	14	0.349 .545	0.164 .134

Los resultados de este experimento ilustran la necesidad de emplear iodo radioactivo "carrer free", sin contaminantes para alcanzar la mayor actividad específica tolerable.

1.5. Efecto del tiempo de marcación:

Como se puede apreciar en el Cuadro N° 15 la oxidación por un período de 1'30'', en contraposición a los 20'' habituales, no motivó un cambio importante de las condiciones de la hormona marcada (los resultados están expresados en la relación B/F:

CUADRO Nº 15

Tiempo de oxidación de la hormona con cloramina-T	20"			1'30"		
	3	6	9	2	6	9
Fracción examinada						
Antisuero diluido a 5×10^{-5}	5.06	3.77	3.77	3.60	4.29	4.53
Antisuero diluido a 2×10^{-6}	0.46	0.62	0.58	0.59	0.70	0.59

Hasta podría admitirse que al emplear un mayor tiempo de marcación se ha conseguido una mejor preparación.

Por todos los resultados anteriores podríamos concluir que para una adecuada marcación debe tenerse en cuenta:

1. Buffer de marcación ajustado al pH y concentración iónica óptimos de 7.5 y 0.25 M respectivamente.
2. Hormona que se conserve por debajo de -22°C por poco tiempo.
3. El yodo radioactivo debe estar libre de contaminantes ("carrier free").
4. El tiempo de marcación aparentemente no es tan crítico entre 20" y 1'30", como se ha señalado anteriormente.

2. Comparación de los métodos de separación de las hormonas libre y unida al anticuerpo:

Como hemos señalado en el capítulo III, aquí se trata de comparar la metodología, señalando la bondad y dificultades de cada uno de los métodos, con los que el autor ha tenido experiencia personal, fundamentalmente en su aplicabilidad en nuestro medio.

2.1. Radiocromatoelectroforesis:

Ventajas:

- a. Es un método muy objetivo, porque permite graficar la distribución de la hormona en las tiras de papel. En este sentido podemos conocer cual ha sido la eficiencia de la marcación, el grado de purificación de la hormona marcada y la proporción en que la hormona se ha unido al anticuerpo, en cada uno de los momentos de la técnica. (Ver gráficas Nos. 4 y 10).

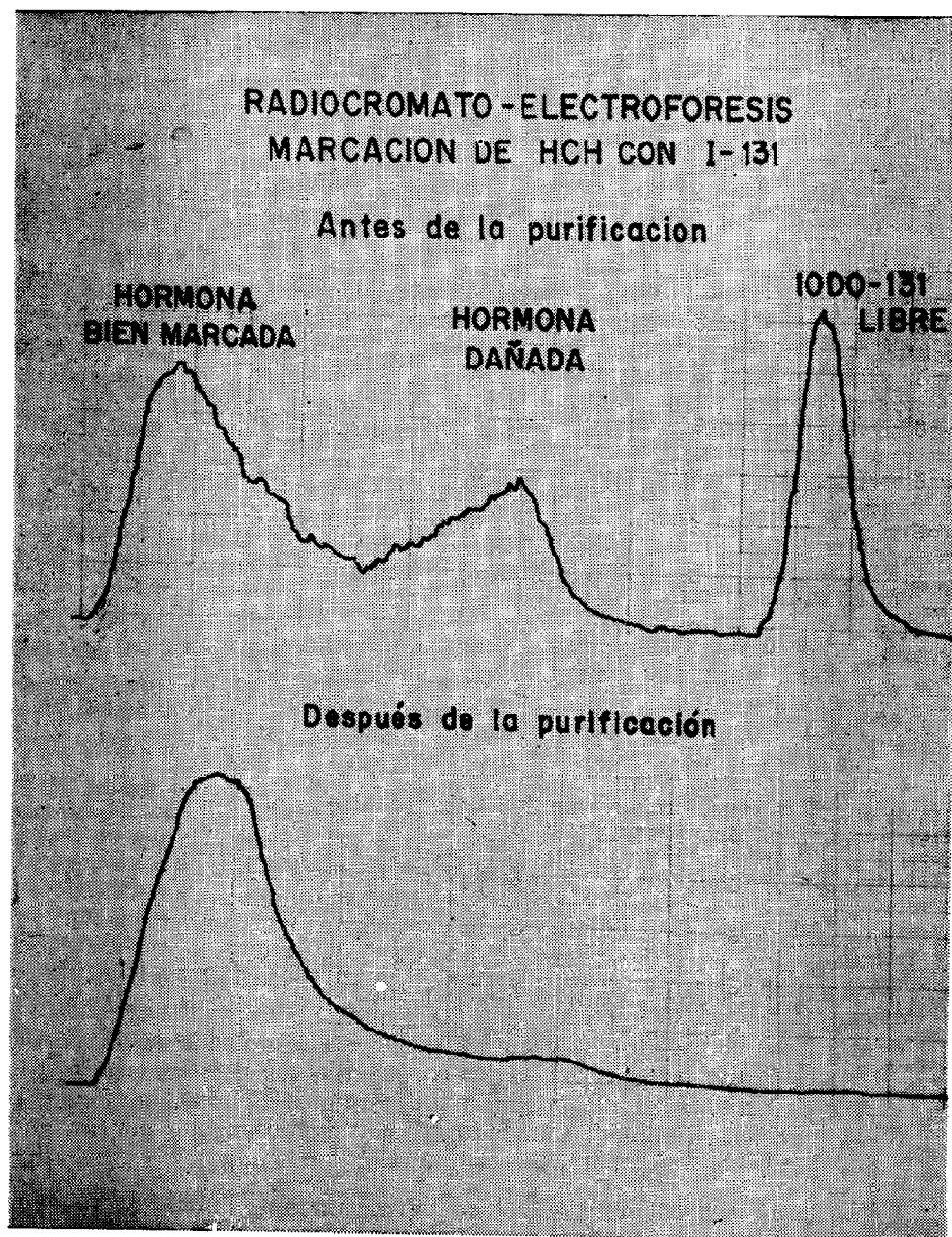


Fig. N° 10.— La radiocromato-electroforesis permite establecer objetivamente la eficiencia de la marcación y el grado de purificación de la hormona marcada.

- b. Después del período de incubación de la hormona con el antisuero, que usualmente dura 3-5 días a 4°C, inmediatamente se puede separar las hormonas unida y libre, sin esperar otro tiempo adicional como ocurre en las otras técnicas.

Desventajas:

- a. Necesita instalaciones (cuarto frío) y equipo costoso para la electroforesis de alto voltaje y un scanner de las tiras de papel, cuyo mantenimiento es así mismo difícil y oneroso.
- b. Se tiene que utilizar únicamente I-131 para aprovechar la radiación beta, lo cual es un problema para un país como el nuestro, que no produce isótopos radioactivos. El I-131 tiene un tiempo medio de vida únicamente de 8.6 días. El transporte entre los EE.UU. y el Perú dura usualmente 5 días, lo que trae como consecuencia una pérdida importante de la radioactividad.
- c. Las tiras del papel de la electroforesis permiten aplicar un máximo de 0.2 ml., lo que constituye 1/5 de volumen de incubación, esto significa que para obtener un buen número de cuentas, es siempre indispensable contar con hormona marcada a una alta actividad específica.
- d. No todas las hormonas se adsorben adecuadamente al papel de electroforesis. Inclusive en el caso de la insulina, que es la que mejor se separa por este método, es necesario encontrar el lote más conveniente, se ha visto que para una misma calidad de papel existen diferencias de un lote a otro.

Por todos estos inconvenientes esta técnica está siendo abandonada, inclusive por sus precursores (14).

2.2. Método del doble anticuerpo:

Ventajas:

- a. Es aplicable a todo tipo de hormona.
- b. Permite el uso de I-125, cuyo tiempo medio de vida es de 60 días. Por lo tanto no se suscitan los inconvenientes del tiempo de transporte. Así mismo uno puede realizar repurificaciones periódicas de la hormona marcada, pudiendo utilizar un preparado por un período hasta de 2 meses.
- c. Es muy reproducible. Esto ha permitido una buena comparación de resultados obtenidos en diferentes laboratorios.
- d. No requiere un equipo muy costoso. La incubación se puede efectuar en una refrigeradora standard. Se necesita únicamente un con-

tador de centelleo tipo pozo. El autor ha utilizado uno de tipo manual marca Nuclear Chicago. Es recomendable contar con un contador automático, por el número de muestras que se suele correr en cada experimento.

Desventajas:

- a. Es indispensable contar con un segundo antisuero, dirigido a precipitar la gammaglobulina del animal, en el que se produjo el antisuero hormonal.

Esto significa un costo adicional y todos los inconvenientes de contar con un producto biológico es decir la titulación de su actividad para cada experimento y el mantenimiento de ella por el mayor tiempo posible.

- b. Es necesario realizar una segunda incubación que dura usualmente 24 horas para que reaccione el segundo anticuerpo.

2.3. Método del carbón revestido con dextran:

Ventajas:

- a. Permite el uso de materiales estables que no se descomponen y cuyo costo es relativamente bajo.
- b. La separación de las hormonas libre y unida al anticuerpo es muy rápida. Se dice que se efectúa en segundos. Se ha visto, sin embargo, que es necesario uniformizar el tiempo de contacto entre el carbón revestido con dextran y las hormonas.

Desventajas:

No es muy reproducible. Se suelen encontrar diferencias entre los duplicados y de un experimento a otro. No hemos podido trabajar en gran escala, por la dificultad anteriormente señalada. Por otra parte la diferente concentración de proteínas presentes en la curva standard y en las muestras problema que contienen plasma o suero, no hace muy superponibles los resultados obtenidos. Este fenómeno hemos podido comprobar, cuando obteníamos muy buenas curvas standard pero sin embargo las muestras problema no daban resultado alguno.

2.4. Método de la precipitación de globulina por procedimientos químicos:

El autor ha tenido experiencia con dos procedimientos.

El uso de la solución saturada de sulfato de amonio y la solución diluida de dioxano (44).

Ventajas y desventajas:

Similares a las señaladas para el método anterior.

B.— Resultados de la aplicación clínica:

1. Insulina:

1.1. Valores basales:

Los valores para los normales de nivel del mar variaron entre 0 y 16 uU/ml (promedio \pm 1 E.S.M. = 9.2 ± 1.31); para los de La Oroya entre 0 y 43 uU/ml (promedio \pm 1 E.S.M. = 9.76 ± 2.33) que no fueron significativamente diferentes.

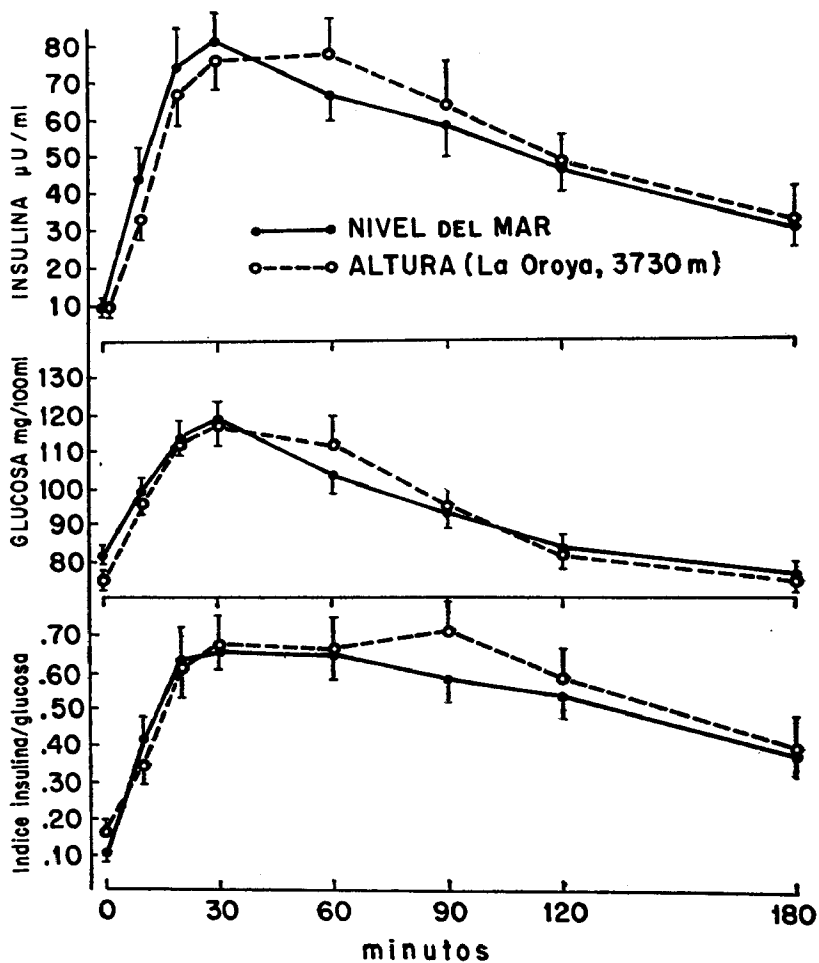


Fig. N° 11.— Comparación de la insulina, glicemia e índice insulina/glicemia en normales de nivel del mar y de altura.

CUADRO N° 16

INSULINA PLASMATICA uU/ml.

	0'	10'	20'	30'	60'	90'	120'	180'
Nivel del Mar	9.20 ± 1.31	43.92 ± 9.06	74.06 ± 11.44	81.44 ± 8.05	66.71 ± 7.61	58.52 ± 8.92	46.30 ± 6.76	29.79 ± 5.13
Altura	9.76 ± 2.33	33.57 ± 5.42	66.91 ± 8.57	76.22 ± 8.48	77.19 ± 10.82	62.95 ± 12.26	47.63 ± 6.95	31.14 ± 9.47
p =	0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GLUCOSA EN SANGRE TOTAL mg/100 ml.								
Nivel del Mar	81.8 ± 2.31	98.9 ± 3.56	114.2 ± 4.31	119.4 ± 3.98	103.5 ± 3.92	93.66 ± 4.68	83.41 ± 3.98	76.54 ± 3.18
Altura	75.2 ± 2.60	96.17 ± 3.22	113.8 ± 3.24	118.2 ± 5.40	112.7 ± 6.58	94.54 ± 4.57	81.45 ± 3.86	75.23 ± 3.63
p =	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
INDICE INSULINA/GLUCOSA								
Nivel del Mar	0.10 ± 0.01	0.41 ± 0.07	0.63 ± 0.09	0.66 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.53 ± 0.06	0.37 ± 0.06
Altura	0.16 ± 0.04	0.34 ± 0.05	0.67 ± 0.08	0.67 ± 0.08	0.65 ± 0.09	0.71 ± 0.11	0.58 ± 0.08	0.39 ± 0.09
p =	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS = la diferencia no es estadísticamente significativa
(Las cifras representan la media ± 1 E.S.M.)

1.2. Sobrecarga oral de glucosa:

En los sujetos de nivel del mar la insulina llegó a su mayor valor (81.74 ± 8.05) a los 30 minutos de administrada para luego decaer en forma lenta hasta los 180'.

En los normales de altura se nota una elevación algo más lenta, la máxima concentración se halló a los 60' (77.19 ± 10.82), que es menor a la del grupo anterior. En ninguno de los tiempos estudiados, las diferencias de los promedios fue estadísticamente significativa.

1.3. Correlación con la glicemia:

La glicemia basal del normal de altura fue diferente a la del nivel del mar cuando fue estudiada en la sangre venosa total, no así cuando fue expresada en concentración por unidad de volumen en el plasma. La administración de 1.75 gr. de glucosa/kg. de peso, no mostró diferencias significativas en la concentración de glucosa en sangre venosa total ni en el plasma de ambos grupos. La determinación del índice insulina/glucosa (tanto en sangre venosa total como en el plasma) no mostró diferencia en los 2 grupos estudiados. Ver el cuadro N° 16 y gráfica N° 11.

2. Hormona luteinizante:

2.1. Mujeres normales:

De 21 mujeres examinadas se han encontrado 2 con ciclo anovulatorio y una sospechosa de carecer ciclo bifásico, por otro lado una cuarta gestó durante el mes de su estudio.

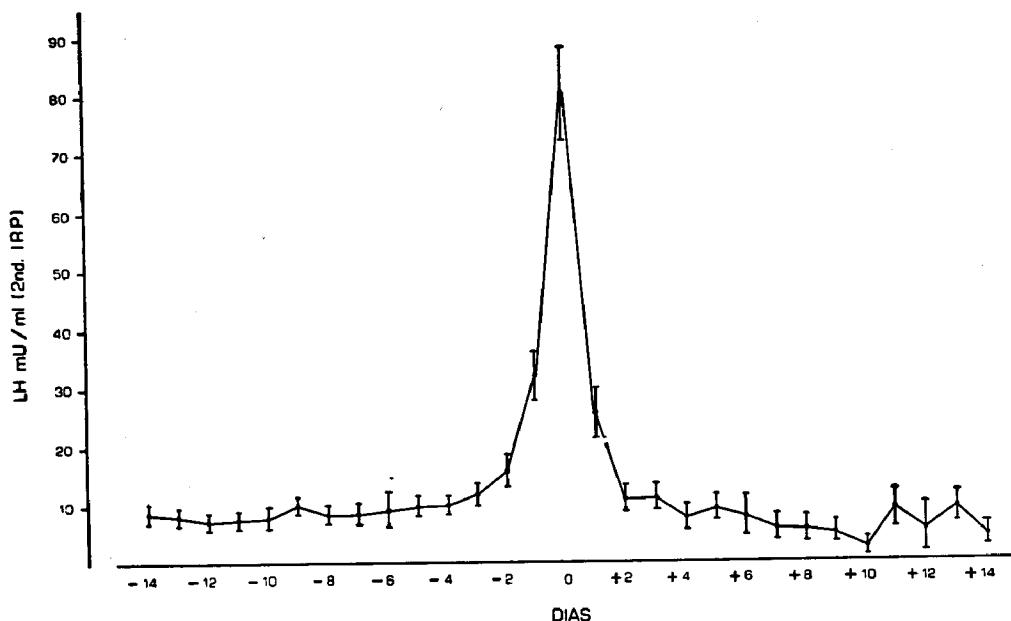


Fig. N° 12.— Concentración promedio de LH durante el ciclo menstrual de 17 mujeres normales.

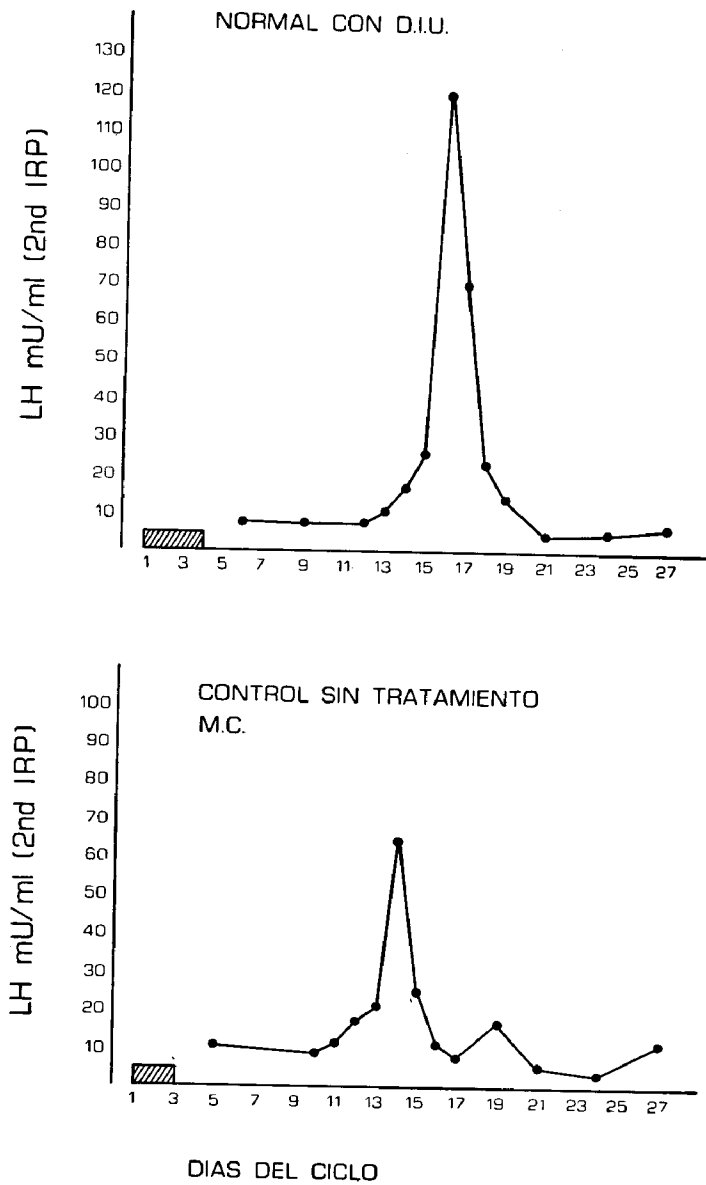


Fig. N° 13.— Concentración sanguínea de LH en dos mujeres, estudiadas a lo largo del ciclo menstrual, una de ellas portadora de un dispositivo intra-uterino (D.I.U.). Las barras horizontales representan los días de la menstruación.

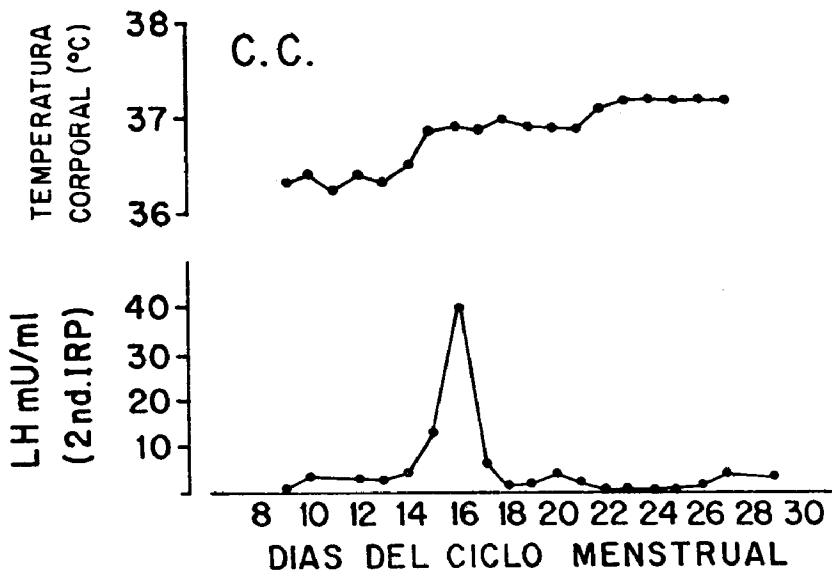


Fig. N° 14.— Variaciones de la concentración de LH y la temperatura basal en una mujer control normal.

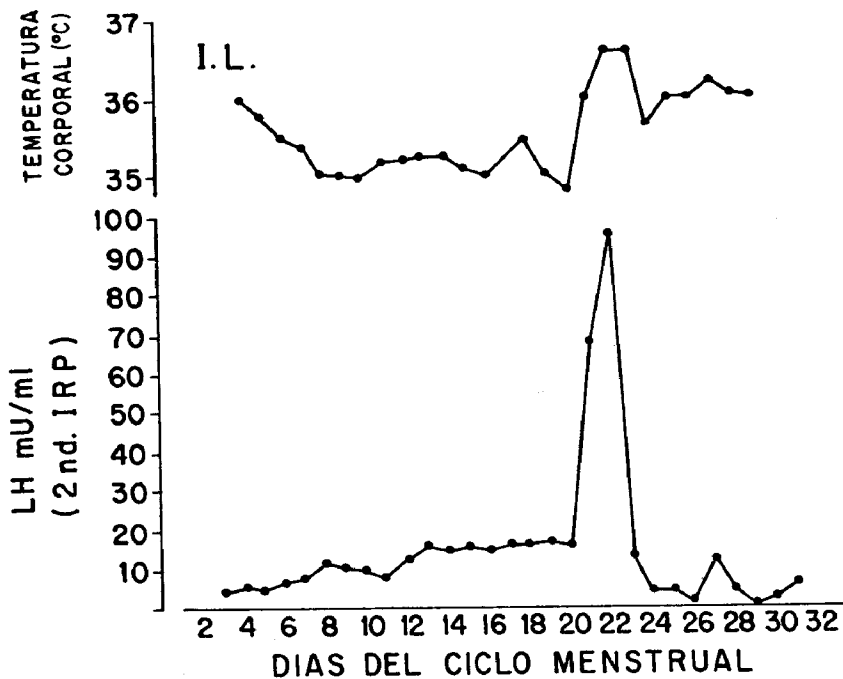


Fig. N° 15.— Ciclo menstrual bifásico normal.

El promedio de la concentración sérica de LH se refiere entonces sólo a 17 mujeres, el cual está representado en la gráfica N° 12. Además ver gráficas Nos. 13, 14 y 15. Para obtener este promedio fue necesario "centrar" los ciclos menstruales tomando en cuenta el valor más alto durante el mismo, a este día como ya es convencional para trabajos de esta índole, se denominó día "0" señalándose entonces los días que preceden (—) o siguen (+) al día "0".

El promedio de LH en la fase folicular fue de 8.93 ± 0.38 mU/ml. (media ± 1 E.S.M.) significativamente mayor ($p = 0.025$), que el valor promedio de la fase luteal, 7.45 ± 0.55 mU/ml. El pico mesocíclico de LH alcanzó a 79.97 ± 7.92 mU/ml., el cual fue precedido de una elevación gradual y rápida con una caída similar.

2.2. Mujeres normales tratadas con enantato de Noretindrona.

2.2.1. Primer mes: hubo abolición del pico mesocíclico en 14 de las 16 estudiadas en el primer mes (Ver figura 16). Unicamente 2 presentaron pequeños picos mesocíclicos (ver fig. N° 17).

El promedio global en este primer mes fue de 8.17 mU/ml., ligeramente por debajo de lo hallado en la fase folicular de las mujeres control.

2.2.2. Segundo mes: En algunas mujeres se notó una tendencia a valores mayores; pero el promedio global fue de 7.41 mU/ml., no observándose picos mesocíclicos en los pocos casos estudiados en este tiempo.

2.2.3. Tercer mes: Los valores son francamente mayores que en los meses anteriores. Se observaron picos mesocíclicos. El promedio global fue 14.4 mU/ml. En algunas curvas individuales los valores son aún mayores que a los de los controles. (Ver figura N° 18).

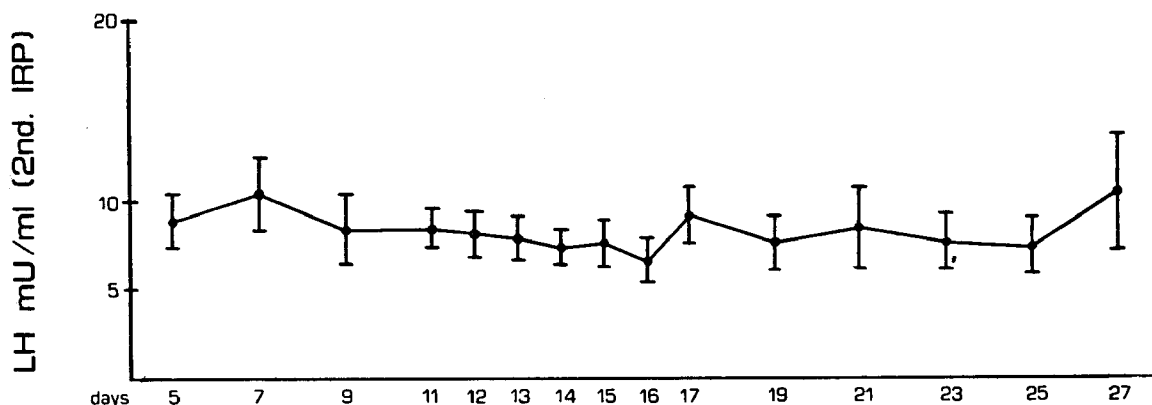


Fig. N° 16.— Concentración promedio de LH en 14 ciclos menstruales de mujeres en el 1° mes post-inyección i.m. de 200 mgr. de enantato de noretindrona.

MUJERES DURANTE EL 1er. MES DE TRATAMIENTO
CON ENANTATO DE NORETINDRONA (200 mg. i.m.)

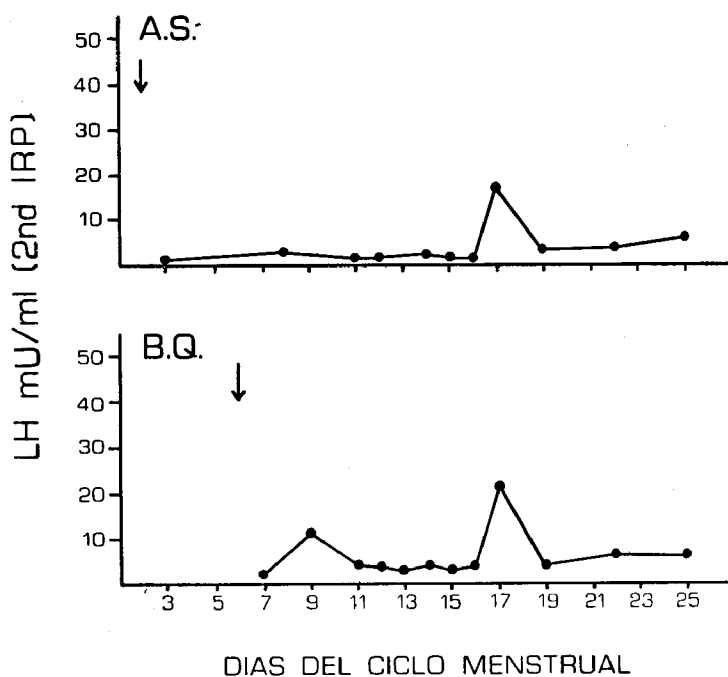


Fig. N° 17.— Concentración de LH en dos mujeres que durante el 1° ciclo después de la inyección de enantato de noretindrona mostraron pequeños picos mesocíclicos.

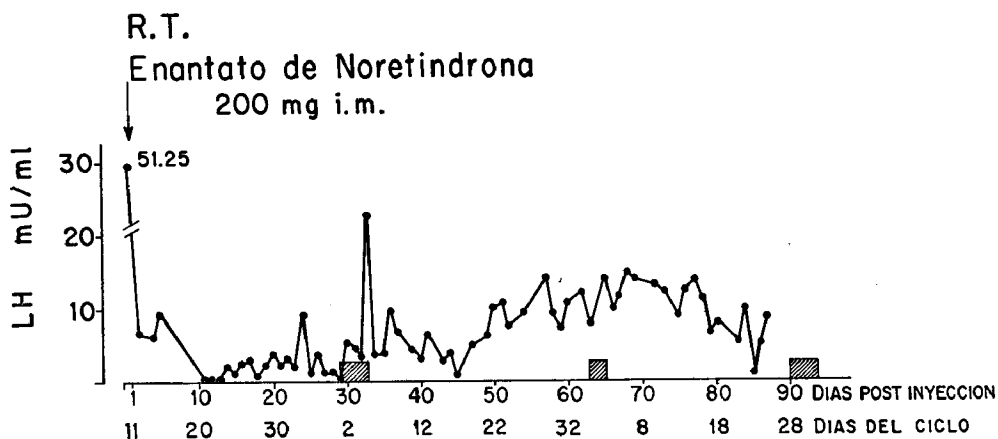


Fig. N° 18.— Concentración de LH en una mujer estudiada durante 3 ciclos post inyección de enantato de noretindrona.

2.3. Mujeres bajo tratamiento continuo con D-Norgestrel.

En 9 de las 10 mujeres estudiadas, bajo este tratamiento anticonceptivo, se observaron picos en su mayoría menores de lo usualmente observado en los controles.

Con el objeto de comparar con los valores de estas últimas, aquí también se consideró como día "O" al mayor valor de LH obtenido durante el ciclo examinado.

En primer término se notó un acortamiento de los ciclos, en gran parte a expensas de la primera fase de los mismos.

En el Cuadro N° 17 se anotan los resultados más importantes en mU/ml:

CUADRO N° 17

	Mujeres controles	Mujeres recibiendo D-Norgestrel	p
Primera fase	8.93	12.25	0.001
Máxima elevación	79.97	41.25	0.001
Segunda fase	7.43	13.26	0.001

Estos datos demuestran que el D-Norgestrel en la dosis utilizada, ocasionó un incremento de LH durante la primera y segunda fase del ciclo menstrual, mientras que la elevación máxima fue significativamente menor que en los controles. (Ver figuras Nos. 19 y 20).

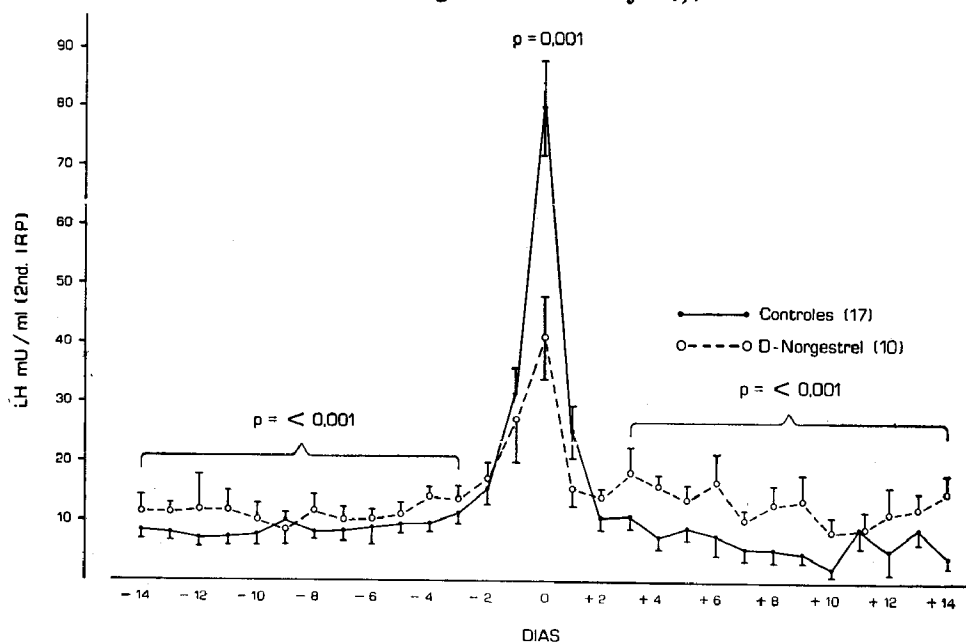


Fig. N° 19.— Comparación de las concentraciones promedio de LH en sangre de mujeres controles vs. mujeres tratadas con d-Norgestrel.

CONCENTRACION DE LH EN SUERO DE MUJERES
RECIBIENDO 0.03 mg DE D-NORGESTREL
EN FORMA ORAL CONTINUA

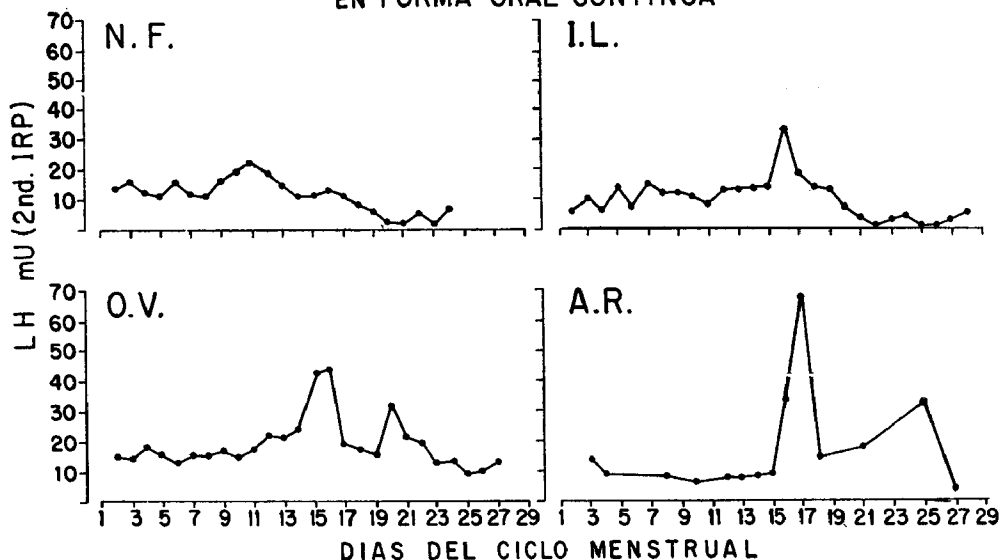


Fig. N° 20.— Casos individuales representativos de las diversas concentraciones de LH a lo largo del ciclo menstrual de mujeres tratadas con d-norgestrel.

2.4. Mujeres tratadas con Acetato de Norethindrona:

Como se puede apreciar en la figura N° 21, este compuesto determinó un cambio completo de la producción de LH, reflejada en una concentración sanguínea elevada y con ausencia de picos mesocíclicos significativos.

MUJERES TRATADAS CON ACETATO
DE NORETINDRONA, 0.3 mg EN DOSIS
ORAL CONTINUA

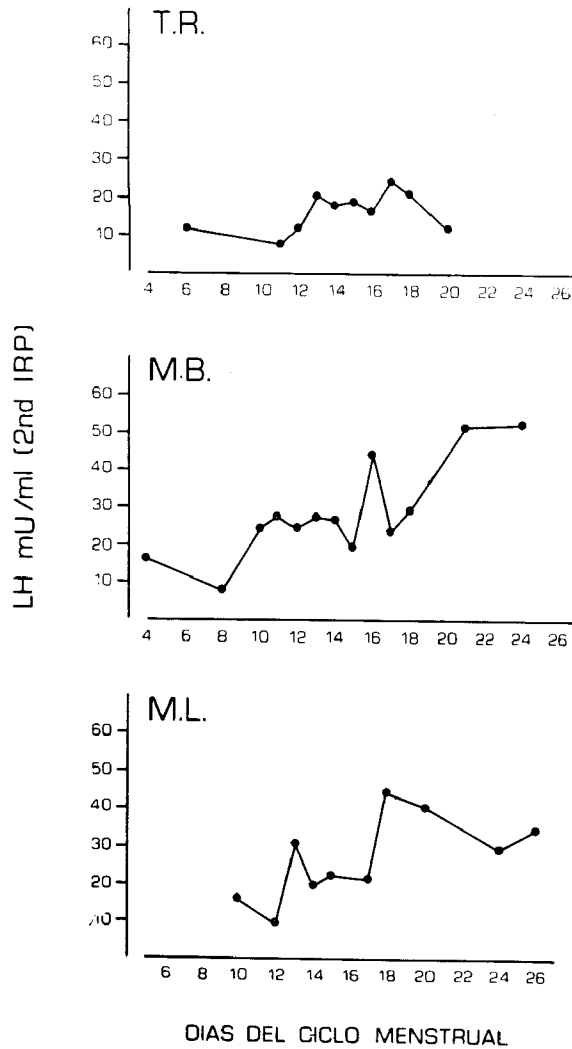


Fig. Nº 21.— Concentración de LH en 3 mujeres tratadas con 0.3 mg. diarios de acetato de Noretindrona.

2.5. Mujeres menopáusicas:

M. C. = 77.5 mU/ml.
V. T. = 27.0
V. V. = 52.5
C. L. = 65.0
R. M. = 105.0, 90.0, 200.0.

En estas cinco mujeres menopáusicas la concentración de LH estuvo elevada. En R. M. la observación durante tres días sucesivos permitió apreciar que los valores altos varían cotidianamente.

2.6. Insuficiencia ovárica primaria:

En los dos casos de síndrome de Turner se encontró los valores más altos de LH, a excepción de mujeres gestantes:

H. M. = 300 mU/ml.
H. L. = 350 mU/ml.

2.7. Insuficiencia ovárica secundaria:

En el único caso de síndrome de Sheehan se halló 2.2 mU/ml. de LH. Esta paciente debería mostrar valores correspondientes a una mujer menopáusica, por estar en edad del cese menstrual, lo que da mayor importancia a este tenor bajo de LH.

2.8. - 2.9. Hombres normales:

En un grupo de 70 hombres normales de nivel del mar la LH estuvo en 10.83 ± 0.52 mU/ml. (Media \pm 1 E.S.M.). En 44 normales de Morococha (4,540 mts. sobre el nivel del mar) se encontró 11.81 ± 0.69 mU/ml. La diferencia de estos dos promedios no fue estadísticamente significativa.

2.10 Insuficiencia testicular primaria:

Los tres pacientes con síndrome de Klinefelter tuvieron valores altos de LH:

M. A. = 80.00 mU/ml.
V. F. = 45.0
G. M. = 18.0

2.11. Insuficiencia testicular secundaria:

En los 4 pacientes con hipogonadismo secundario en los que el dosaje de gonadotrofinas en la orina por un método biológico, había establecido una deficiencia de estas hormonas, la LH no fue dosable en sangre, confirmando el diagnóstico previo.

V. DISCUSION

La importancia y utilidad de las técnicas radioinmunológicas se evidencia día a día, cuando revisamos la literatura y constatamos que todas las hormonas proteicas se han determinado en sangre mediante el uso de ellas. Por otra parte se ha extendido su utilización a otro tipo de hormonas como son los esteroides, que anteriormente se dosaban por métodos colorimétricos, fluométricos, de dilución isotópica, cromatografía de gas, competencia proteica, sin la suficiente sensibilidad, con problemas inherentes a cada una de estas metodologías y que actualmente se las puede determinar cómodamente mediante el radioinmuno-ensayo. No sólo la Endocrinología se está beneficiando con los procedimientos radioinmunológicos, sino que su uso se ha extendido a la cuantificación de otra sustancia como la gastrina, angiotensina, etc. En el Cuadro Nº 18 se encuentra una lista, posiblemente incompleta de sustancias dosadas empleando estos métodos.

Por lo anteriormente expuesto, se desprende que es de extrema necesidad contar con las técnicas radioinmunológicas para poder trabajar científicamente en aspectos importantes de la Endocrinología. No se debe olvidar, sin embargo, que su desarrollo implica el conocimiento de diversos detalles con el objeto de que sea realmente un método que cumpla las mínimas exigencias de sensibilidad y especificidad.

En el capítulo de generalidades, se ha expuesto en primer término, que el fundamento de ellas reside en la reacción competitiva de dos antígenos por saturar los sitios de enlace de un anticuerpo; estos dos antígenos son teóricamente iguales en su capacidad inmuno-reactiva, con la única diferencia, de que uno está marcado con iodo radioactivo y el otro permanece igual.

El antígeno en ambos casos debe ser muy puro, tanto para producir el antisuero respectivo como para reaccionar en el experimento in vitro. En el caso de que estuviera contaminado, el método pierde la necesaria especificidad. Esto es más importante para hormonas cuya naturaleza química semejante determina reacción cruzada, como es el caso de las 2 gonadotropinas, LH y FSH. Si no se obtiene un preparado que haya eliminado a una de ellas, el antisuero por una parte elevará anticuerpos para las dos, a más de la natural reacción cruzada que ambas tienen; como estas dos hormonas normalmente están presentes en la sangre, se comprende fácilmente, que se estará midiendo a ambas al mismo tiempo.

CUADRO Nº 18

Sustancias determinadas por técnicas radio-inmunológicas

Insulina; Yalow y Berson, 1960 (8).

Glucagon; Unger, Eisentrant, McCall, Keller, Lauz y Madison, 1959, (45).

Hormona de crecimiento; Utiger, Parker y Danghaday, 1961 (46).

Parathormona; Berson, Yalow, Aurbach y Potts, 1963 (47).

ACTH; Felber, 1963 (48).

Hormona luteinizante; Midgley y Ram, 1965 (49).
 Hormona folículo estimulante; Franchimont, 1966, citado por Rosselin y Dolais (50).
 Hormona lactogénica placentaria; Kaplan y Grumbach, 1965 (51).
 Vasopresina; Roth, Glick, Klein y Petersen, 1966 (52).
 Oxitocina; Glick, Wheeler, Kagen y Kumerasan, 1968 (53).
 Hormona tirotrófica; Odell, Wilber y Paul, 1965 (29).
 Gastrina; McGuigan, 1968 (54).
 Progesterona; Abraham, Swerdloff, Tulchinsky y Odell, 1971 (8).
 17-Hidroxiprogesterona; Abraham, Swerdloff, Tulchinsky, Hopper y Odell, 1971 (55).
 Pancreozimina-colecistoquinina; Young, Lazarus Chistoholm y Atkinson, 1968 (56).
 Secretina; Young, Lazarus y Chistoholm, 1968 (57).
 Prostaglandina F; Cadwell, Burstein, Brock y Speroff, 1971 (58).
 (Los números en paréntesis indican las referencias bibliográficas).

La especificidad del antisuero no sólo se consigue mediante el uso de un antígeno puro, sino que en circunstancias, como la que se ha delineado anteriormente, es necesario absorber el antisuero con la hormona que no se quiere medir, saturando en esta forma desde un inicio los anticuerpos contra ésta. Pese a estos cuidados es indispensable establecer la especificidad en un antisuero poniéndolo en contacto con diversas hormonas químicamente parecidas.

Esto ha sido el caso del antisuero anti-HCG que hemos utilizado para el dosaje de LH (43), que se le hizo reaccionar con FSH, TSH y ACTH, encontrándose que ésta fue muy débil, de tal modo que empleando 100 ul de antisuero a una dilución de 1:60,000 (la dilución final es de 1:600,000 cuando se aplica a 1 ml. del medio de incubación) estas hormonas no interfieren en forma absolutamente significativa.

Una vez en posesión de un antígeno hormonal puro y un antisuero altamente específico, es necesario considerar los aspectos más importantes de la obtención del tercer elemento indispensable de la reacción delineada anteriormente, esto es la hormona marcada, que inmunológicamente debe actuar en forma igual que la hormona no marcada.

En este sentido nuestra experiencia personal, nos ha permitido evaluar puntos muy importantes de la marcación. Muchas veces se descuida determinar previamente el pH del buffer utilizado con esta finalidad, lo cual puede disminuir la eficiencia de marcación, es decir el porcentaje de iodo radioactivo incorporado a la molécula hormonal.

Los antígenos marcados y no marcados como el antisuero deben ser conservados a congelación, cuanto menor sea la temperatura el tiempo de conservación será mayor. Las descongelaciones reiteradas pueden ocasionar un daño importante de ambos, por lo que es necesario guardarlos en pequeños volúmenes, de tal modo que sirvan para un experimento.

Hemos podido observar que el largo tiempo de almacenaje puede determinar pequeños cambios de la capacidad inmunoreactiva de la hormona antígeno. Es preferible conservar la hormona liofilizada seca y efectuar su dilución cada cierto número de meses para su utilización.

Cuando se comparó insulina purificadas en dos laboratorios distintos (Mirsky y Eli Lilly) no hemos encontrado mayor diferencia. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el origen de la hormona, así como su capacidad biológica y su cantidad absoluta determinada por el radioinmuno-ensayo. La LH suministrada por la Dra. Ann.e S. Hartree, se señala que tiene una potencia 5 veces mayor a la del standard internacional conocido como NIH-LH-SI. Nosotros hemos encontrado que este preparado contiene 4,512 UI/mg, en términos del 2º IRP (Ver figura N° 22). Su trascendencia es mayor cuando se trata de las gonadotrofinas, que han sido comparadas de acuerdo a diferentes patrones, esta confusión se agrava por la comunicación de resultados indistintamente en peso o en unidades biológicas.

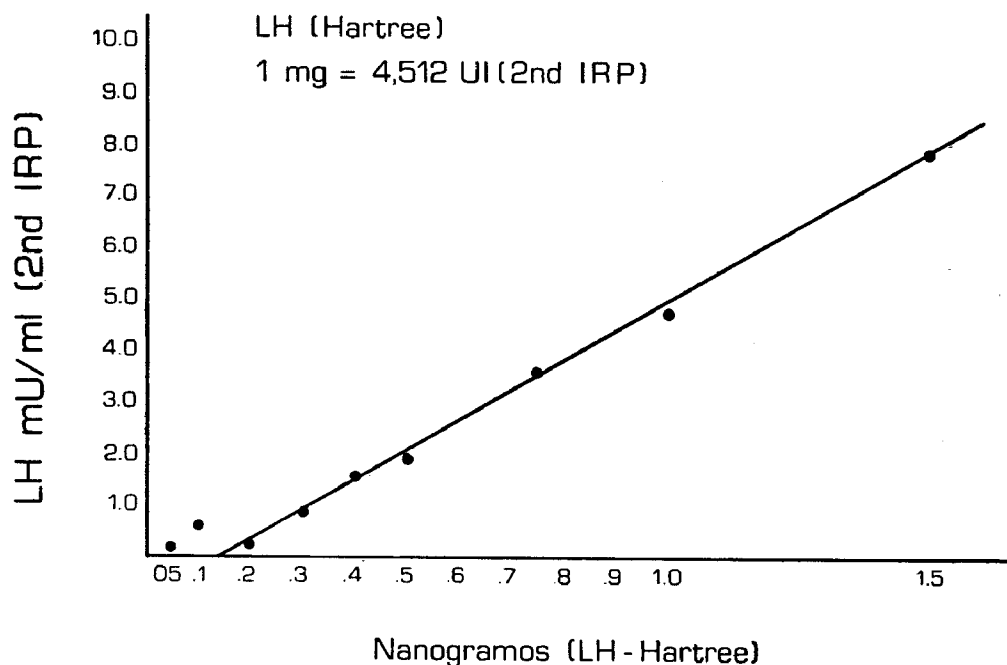


Fig. N° 22.— Equivalencia entre peso y unidades biológicas de la LH purificada (Hartree) utilizada para la marcación con I-125.

En el caso de la insulina hemos utilizado para la marcación una preparación de origen porcino cuya actividad corresponde a 23.9 UI/mg. En cambio para el standard se empleó insulina de origen humano con una actividad de 26.9 u/mg. aprovechando la reacción cruzada entre insulina humana y porcina, ampliamente utilizada por muchos investigadores, debido sustancialmente a la dificultad de poder contar con suficiente cantidad de insulina de origen humano.

En el experimento consignado con el numeral 1.3 hemos marcado insulina a 2 muy diferentes actividades específicas, 100 y 1,000 mCi/mg., sin que pudiéramos encontrar diferencias en la capacidad inmunoreactiva de ambos preparados, se obtuvo una correlación matemática en la cantidad de insulina marcada presente en cada una de las fracciones de ambas preparaciones correspondiendo a una diferencia de 1:10 exactamente igual a la de sus actividades específicas. Este experimento ilustra la importancia de marcar la hormona a altas actividades específicas, la preparación marcada a 1,000 mCi/mg. contiene una masa 10 veces menor que la de 100 mCi/mg. Esto significa que va a competir en la misma proporción con los enlaces del anticuerpo que mantenemos a un título constante. El empleo de esta pequeña masa de hormona determinará un incremento de la sensibilidad del método.

Por otra parte es muy demostrativo de la posibilidad de usar la misma hormona marcada con dos isótopos radioactivos, en este caso para establecer exactamente la masa del tracer.

Esta facilidad ha sido explotada adecuadamente para medir en una misma muestra dos hormonas diferentes, cada cual marcada con un isótopo diferente. Glick y Kagan (59) la han empleado para medir hormona de crecimiento e insulina; Young y Kraegen (60) para dosar insulina y glucagon. Se mide la radioactividad cambiando la ventana del escalímetro y aprovechando la circunstancia de que el I-125 y el I-131 con isótopos con radiación gamma de muy diferente energía.

La calidad del iodo a utilizar en la marcación es crítica para lograr una buena preparación. Debe estar en lo posible libre de material estable y otras contaminantes, entre estos últimos sustancias reductoras, que neutralizan la actividad oxidativa de la cloramina-T, indispensable para la incorporación del iodo a la molécula. Se recomienda la utilización de iodo radioactivo denominado "carrier free" por el grado de su pureza, aspecto que obviamente escapa al control del investigador.

Berson y Yalow (61) han encontrado grandes diferencias en la calidad del iodo "carrier free" producido por diferentes laboratorios, situación que cambia la eficiencia de marcación y la misma calidad de la hormona marcada. Estos autores han podido establecer que las preparaciones de I-131 consideradas como "carrier free" tienen por lo general únicamente una riqueza real del 35 - 44% de I-131, a veces han constatado que algunos lotes poseían sólo 5% de I-131. Si se obtuviese iodo absolutamente "carrier free" su actividad específica sería de 125 mCi/ug.

La adición de iodo estable (I-127) a la marcación de HCH nos ha permitido observar que la eficiencia de marcación y la capacidad inmuno-reactiva permanecen iguales e inclusive se incrementan hasta el momento en que teóricamente se incorporó 2.5 átomos de I-127 por molécula. Este fenómeno se explica recordando que la molécula de HCH tiene 8 radicales tirosilo, a cada uno de los cuales se puede incorporar 2 átomos de I⁻ o sea que tiene suficiente capacidad de recibir más iodo que el suministrado en forma radioactiva. En el Cuadro N° 19 se describen las características de diferentes hormonas proteicas en relación a su capacidad de incorporar iodo en su molécula (62).

CUADRO N° 19

Hormona	P.M.	Nº de grupos tirosilo/mo- lécula	Actividad específica de 1 átomo de I-131/ molécula mCi/mg.	Actividad específica máxima mCi/mg.
ACTH	4,500	2	3,600	14,400
Insulina	6,000	4	2,700	21,600
Parathormona	9,000	1	1,800	3,600
Hormona de crcimiento	20,000	8	810	12,960

La disminución de la relación B/F a medida que se fue incorporado mayor número de átomos de I-127 por molécula de HCH puede ser consecuencia de la progresiva disminución de la actividad específica y la consiguiente necesidad de aumentar la masa de HCH-I-131 para obtener una cantidad semejante de radioactividad, así como también a una disminución de la capacidad inmunoreactiva ocasionada por la incorporación de I-127 (63), (64).

La técnica de marcación de polipéptidos y proteínas, actualmente más utilizada, es la descrita por Greenwood, Hunter y Glover (23), que aprovecha la acción oxidativa de la cloramina-T. Tiene el inconveniente de exponer la molécula proteica a la solución radioactiva, que indefectiblemente daña a la hormona en un grado variable, dependiendo en parte del tiempo de exposición, como a las características de la solución de marcación. Este daño, que por ello se llama "daño de marcación", suele ser disminuido acortando el tiempo de exposición a más o menos 20".

En una experiencia hemos comparado dos preparaciones marcadas durante 20" uno de ellas y la otra en 1'30", sin haber encontrado una diferencia notable. Se acepta que el daño de marcación no depende tanto de la acción de las radiaciones ionizantes como de las sustancias reductoras, que se encuentran en la solución del Na I-125 o Na I-131. Probablemente el iodo utilizado en este experimento contenía muy poca cantidad de ellas.

A actividades específicas iguales, la marcación con iodo 125 presupone la introducción de 8 veces más átomos de iodo radioactivo que cuando se emplea I-131. Esto está en relación al tiempo medio de vida y su cálculo se deriva de la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de átomos/mCi} = 3.7 \times 10^7 \times 1.443 T \quad (65)$$

(T = tiempo medio en segundos)

Este hecho junto con la dificultad de contar con I-125 de mejor pureza, aconsejan efectuar marcaciones con I-125 a actividades específicas menores que cuando se utiliza I-131.

El empleo directo de cuatro diferentes técnicas nos ha permitido establecer las ventajas y desventajas de cada procedimiento. Como producto de esta experiencia consideramos, que el método del doble anticuerpo es el más factible de ser utilizado en nuestro medio, dado que no requiere instalaciones ni equipos especiales, a más del básico, para cualquier medición de radiación gamma. Se puede utilizar I-125, que por su tiempo medio de vida relativamente largo y por ser un emisor exclusivo de radiación gamma de baja energía, lo hacen sumamente conveniente para trabajar in vitro, de preferencia en nuestro país. Como hemos señalado anteriormente se lo puede utilizar para el dosaje de cualquier hormona proteica. Los resultados son muy reproducibles dentro de un mismo experimento o entre dos experimentos diferentes. Su uso ampliamente difundido permite además la comparación de resultados entre varios investigadores. La única desventaja reside en la necesidad de emplear un suero antigamma globulina del animal en el cual se produjo el primer antisuero. En el comercio se obtienen preparados muy buenos aunque de costo elevado. Como toda preparación biológica requiere cuidado para su conservación, el cual comienza desde su transporte hasta el momento de su uso. Hemos podido observar que estos sueros antigamma globulina deben ser diluidos, a veces hasta 1:32 para una reacción más eficiente, que ciertamente determina una disminución del costo.

Aparte de una comunicación preliminar anterior (66), esta es la primera oportunidad en que se da a conocer los valores normales de insulina en sangre para nuestro medio.

Las cifras basales de 9.2 y 9.76 uU/ml. para sujetos normales de nivel del mar y altura respectivamente son iguales, pero resultan relativamente bajos comparando con las descritas para Yalow y Berson (9), (35), quienes utilizando la radiocromatoelectroforesis señalan valores de insulina entre 0 - 60 uU/ml. con un promedio de 21 uU/ml., así mismo valores más altos han sido reportados por Samols y Bilkus (67) y Hales Randle (24) empleando el método de doble anticuerpo. Meade y Klitgaard (30) con el procedimiento de resinas de intercambio iónico reportan un valor promedio de 11 uU/ml., Soeldner y Slone (68) encuentra 7 uU/ml.; valores entre 6 a 10 uU han sido también reportados por otros (69), (70). Probablemente estas diferencias están relacionadas a la metodología, a los diferentes orí-

genes y actividad biológica de la hormona utilizada como standard y para la marcación, así como a la diversa afinidad de los antisueros y la longitud del ayuno previo a la determinación. La insulinemia disminuye en razón directa al tiempo de ayuno (71), (72). La sensibilidad del método que hemos empleado permite dosar hasta 0.25 uU/ de insulina. Si nosotros empleamos 0.1 a 0.2 ml. de plasma, significa que estamos en situación de medir entre 1.25 a 2.5 uU de insulina por ml. de plasma o suero, sin embargo se suele encontrar en ayunas algunos casos en los cuales la concentración de insulina está por debajo de la sensibilidad anteriormente señalada.

Tanto por métodos biológicos (73), (74), (75), como inmunológicos (24), (30), (35), (68) se ha demostrado que la administración de glucosa determina un aumento de la concentración de insulina en la sangre; en cinco minutos alcanza el mayor valor cuando es por vía endovenosa (76), (77), (78), mientras que la ingestión oral determina un incremento máximo entre los 30 a 60 minutos. En los sujetos de nivel del mar el promedio a los 30 minutos alcanzó a 81.74 uU/ml, que viene a ser 9 veces mayor del basal, en cambio en los de altura la elevación máxima fue a los 60' y 7.9 mayor que su basal. Estas diferencias no fueron sin embargo estadísticamente significativas.

Como ha sido descrito en la literatura (35), (69), (78), (79) a partir de ese momento se observa una gradual reducción de la insulinemia, que recién alcanzará valores basales en la cuarta hora (80). Es muy importante correlacionar la glicemia con la insulinemia con el objeto de establecer si existe una adecuada proporción entre ambas. En los dos grupos que hemos estudiado el índice insulina/glucosa fue idéntico, revelándonos una igual sensibilidad pancreática a las variaciones de la glicemia. Esto tiene una especial importancia considerando que la concentración basal de glucosa en el normal de altura es menor que la del normal de nivel del mar (81), (82), (83), (84), (85), (86).

Los glóbulos rojos tienen una menor concentración de glucosa que el plasma (87), (88), (89), (90); el sujeto normal de altura tiene un hematocrito mayor que el de nivel del mar, por lo que se podría inferir que la menor glicemia del primero estaría condicionado por el hematocrito, sin embargo el estudio directo de este factor ha permitido a Garmendia, Arroyo y Muro (91) demostrar que el hematocrito influye únicamente en parte y que existe algún otro fenómeno involucrado en la glicemia baja de altura. A 3,730 mts. sobre el nivel del mar (La Oroya) los anteriores autores han encontrado, que la baja concentración de glucosa en los glóbulos rojos era responsable de la diferencia hallada en sangre total, ya que en el plasma se encontraron cifras semejantes. En cambio a una mayor altura (Morococha, 4,540 mts. sobre el nivel del mar) la concentración de glucosa en el plasma es mucho menor que a nivel del mar (92). La determinación de insulina y otras hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa era pues de la mayor importancia. Por el presente estudio queda demostrado que el sujeto de altura no produce una mayor cantidad de insulina, que explique la menor glicemia, aún cuando la hormona de crecimiento (10), glu-

cagon (93) y ácidos grasos, libres (94) se encuentran aumentados en el nativo de altura, modificaciones bioquímicas que favorecen el incremento de insulina en sangre (28), (35), (95), (96), (97), (98), (99), (100), (101). Estos resultados nos hacen pensar que el individuo expuesto a una atmósfera de baja tensión de oxígeno tiene por esta situación una "tendencia a la hipoglicemia", lo que podría explicar el incremento de hormona de crecimiento y secundariamente a ello la mayor liberación de ácidos grasos libres. La insulina debería estar disminuida por la "hipoglicemia", pero probablemente permanece igual debido al mecanismo compensatorio señalado anteriormente.

La administración de 1.75 gr. de glucosa por kg. de peso no mostró un diferente comportamiento en la utilización de glucosa entre ambos grupos estudiados, tal vez porque el estímulo fue muy grande, haciendo desaparecer cualquier pequeña diferencia, situada en el rango fisiológico. Este error han cometido la mayoría de investigadores dedicados al estudio de la fisiología de altura, cuando han utilizado con este propósito sobrecargas más bien destinadas a establecer límites de normalidad y patología.

Está demostrado que la respuesta insulinémica es proporcional a la cuantía de la sobrecarga de glucosa por vía oral (102), de allí que tal vez con sobrecargas menores pueda ser factible encontrar diferencias en el metabolismo de los hidratos de carbono entre los individuos de altura y nivel del mar.

Hemos preferido la administración oral de glucosa a la endovenosa por representar un esquema más fisiológico. Se ha descrito que la glucosa por vía oral determina una mayor secreción de insulina que por vía endovenosa (77), (103), (104). Este fenómeno se lo vincula con la movilización de glucagon "intestinal" (106), (106), secretina y pancreozimina (56), cuyos efectos insulinogénicos han sido comprobados (22), (108), (109), (110), (111), (112), (113), (114).

La "tendencia a la hipoglicemia" del nativo de altura, que hemos anotado anteriormente, no sería pues más que el efecto directo de la hipoxia sobre la utilización de glucosa a nivel celular. Picon-Reátegui (86) ha demostrado que el sujeto de altura tiene una mayor capacidad de extracción de glucosa por los tejidos extrahepáticos, Murphy (115) ha señalado que el eritrocito muestra una mayor utilización de glucosa cuando el pH vira hacia una mayor alcalinidad o hay una disminución de la saturación de oxígeno, situaciones que han sido encontradas en el individuo de altura (116), (117).

Antes de la época de la determinación inmunológica de hormonas, las gonadotrofinas se han solido determinar por métodos biológicos, aún vigentes para fines clínicos. Estos métodos biológicos utilizan animales intactos o hipofisectomizados midiendo los cambios ocasionados por los extractos urinarios o plasmáticos sobre el peso, estructura y composición química del ovario, (39), (118), (119), (120), (121), (122), testículo (123), vesículas seminales (125), próstata (125) o útero (126).

Muchos de ellos miden la actividad total de los gonadotrofinas hipofisarias, es decir tanto de FSH como de LH, por lo tanto carecen de especificidad. La sensibilidad es pobre, por lo que es necesario preparar extractos de un buen volumen de sangre para poderlas medir en este compartimiento, complicando con ello su procedimiento, a más que no son muy reproducibles por estar sujetos a variaciones en la respuesta, dependientes de la cepa, alimentación, edad y medio ambiente de los animales.

En 1961, Wide, Roos y Gemzell (127) pudieron demostrar que la LH poseía similitud inmunológica con la HCG, dado que reaccionaban cruzadamente con el mismo suero anti-HCG. Este hallazgo junto con la obtención de hormona luteinizante pura (128) permitió posteriormente dosar esta hormona en orina por el método de la inhibición de la hemaglutinación (129) y en sangre por procedimientos radioinmunológicos (49), (130).

Para la determinación de la hormona luteinizante (LH) hemos empleado el método descrito por Odell y col. (11), (130) con pequeñas modificaciones, impuestas para procurar una mayor sensibilidad al procedimiento, adaptarlo a nuestro laboratorio y disminuir su costo. Se ha empleado suero normal de conejo no al 2.5% y desde el inicio de la incubación como indican los autores mencionados, sino al 1% poco antes de aplicar el segundo antisuero. La dilución del segundo antisuero de 1:3 hasta 1:12 nos permitió una mejor precipitación de la gammaglobulina de conejo. Nosotros hemos utilizado un suero anti-HCG diluido a 1:60,000 (dilución final 1:600,000), aprovechando la reacción cruzada entre LH y HCG, comentada anteriormente. Se pueden emplear antisueros más específicos como el obtenido por Schaleh y col. (131) mediante la inmunización de cobayos con LH de origen pituitario; sin embargo la dificultad de contar con cantidades suficientes de este preparado obliga a emplear suero anti-HCG, práctica que por otro lado esta ampliamente difundida (11), (43), (132), (133), (134), (135), (136).

Como standard de referencia hemos empleado el 2nd IRP (2º Preparado Internacional de Referencia) que permite una buena comparación de resultados con otros investigadores. Este preparado ha sido obtenido de la orina de mujeres menopáusicas y contiene cantidades iguales de FSH y LH (40 UI por ampolla), por lo que se le puede usar como standard indistintamente para el dosaje de ambas.

Con el método, descrito en detalle, hemos podido dosar cantidades tan pequeñas como 0.25 mU. Empleando 0.2 ml. de suero o plasma, la sensibilidad del método permite medir 1.25 mU/ml., suficiente como para realizar estudios en el rango fisiológico.

De 21 mujeres normales examinadas a lo largo del ciclo menstrual únicamente 17 mostraron variaciones de LH compatibles con ciclos ovulatorios, es decir que presentaron una rápida e importante elevación o "pico" mesocíclico, cuyos valores variaron entre 27 a 130 mU/ml., significando un incremento de 4 hasta 22 veces la concentración previa de la fase folicular (promedio 9.34).

Odell, Roos y Rayford (11) han encontrado ausencia de pico ovulatorio de LH en 3 de 30 mujeres normales estudiadas, proporción aproximadamente semejante a la hallada por nosotros en un número menor de mujeres examinadas. Bedoya, Kesserü y García (137) no pudieron demostrar ovulación en 1 de 5 mujeres control en el estudio histológico del ovario por lo que asumen que ocasionalmente una mujer normal puede tener ciclos anovulatorios.

En la fase folicular se encuentra una mayor concentración de LH que en la fase luteal tal como ha sido reportado por los mismos autores (11).

La elevación mesocíclica de LH ha sido también demostrada aunque con menor precisión por métodos biológicos (138) e inmunológicos basados en la inhibición de la hemaglutinación (129), (139) y guarda una interrelación estrecha con la producción de FSH, progesterona y estrógenos.

La FSH presenta dos elevaciones importantes al inicio del ciclo y otra en la mitad, casi coincidiendo con el pico de LH (50), (140). La progesterona está en una concentración muy baja durante la fase folicular y se incrementa gradualmente a partir de la ovulación durante toda la fase luteal, cayendo rápidamente poco antes de la siguiente menstruación (8).

Los estrógenos muestran dos elevaciones importantes durante el ciclo en la mitad del mismo y durante la fase luteal (8), (140).

El mecanismo de acción de los anticonceptivos hormonales es complejo y no está limitado a un efecto anovulativo, por bloqueo de la producción de las gonadotrofinas, sino que también se extiende a modificaciones de la función ovárica, composición del mucus y contractibilidad de las trompas, variaciones en las características del endometrio, así como también a variaciones físico-químicas del moco cervical, ocasionando una perturbación a la normal penetración de los espermatozoides.

En el presente trabajo únicamente hemos estudiado las variaciones de la producción de LH, mediante el dosaje de su concentración en sangre, consecutiva a la administración de diferentes anticonceptivos hormonales de tipo progestágeno carentes de estrógenos.

El enantato de Noretindrona, es un derivado de la 17-etinilnortestosterona, la modificación de su fórmula le ha privado de su acción androgénica; dándole una acción progestacional. Cuando se le administra en la dosis de 200 mg. por vía i.m. su efecto anticonceptivo dura 12 semanas (141).

Este compuesto indudablemente afecta la producción de LH, especialmente al inicio de su aplicación. Durante las cuatro primeras semanas, únicamente 2 de 16 mujeres presentaron elevaciones mesocíclicas de LH, menores en valores absolutos a las que se suele observar en mujeres controles (17.5 y 21.0 mU/ml.), sin embargo en estos picos significaron un incremento de 4.4 y 8.8 veces los valores previos de LH. Diczfaluzy y col. (142) han señalado que mayor importancia para la ovulación tiene no tanto la altura de los picos como la diferencia con los valores de la fase prolifera-

tiva. La concentración promedio de LH en las cuatro primeras semanas de tratamiento con el enantato de noretindrona fue menor que lo hallado en la fase proliferativa indicando una depresión de la función pituitaria a este respecto.

Posteriormente se nota una gradual liberación del hipotálamo-hipófisis por el creciente aumento de la concentración de LH, más evidente en las cuatro últimas semanas, en que el promedio global de LH alcanza a 14.4 mU/ml. que es casi el doble de lo encontrado en las fases folicular o luteal. También ocasionalmente se observaron picos mesocíclicos durante el 3º mes de tratamiento, lo que hace pensar que en algunas ocasiones se produce un "escape" al efecto frenador de la ovulación.

En este sentido Kesserü y Larrañaga (143) han demostrado muy objetivamente, que el enantato de noretindrona determina cambios progesteronales en endometrio, mucosa vaginal y moco cervical fundamentalmente en el 1º mes de tratamiento, mientras que su acción parece circunscribirse al factor cervical en los 2 siguientes meses. Esta afirmación se basa en el hallazgo de variaciones bifásicas en las características histológicas del endometrio y el índice cariopictórico de las células vaginales; la demostración de la formación de cuerpo lúteo en el estudio directo macro y microscópico de los ovarios (137) y la excreción urinaria bifásica de pregnandiol (144). Los referidos autores postulan que en una parte de mujeres tratadas con este anticonceptivo de depósito se puede producir ovulación.

El D-Norgestrel, progestágeno sintético usado en la microdosis oral continua de 0.03 mg. diarios es un buen elemento anticonceptivo (145), cuyo efecto sobre la producción de LH es un tanto diferente al enantato de Noretindrona.

En primer término la concentración de LH durante la primera y segunda fase del ciclo menstrual fue mayor que los encontrados en la fase folicular y luteal de las mujeres control. Por otra parte los llamados picos se han presentado como mayor frecuencia, en 9 de 10 fue factible encontrar estas elevaciones, aunque de menor magnitud (rango de variación = 17.5 a 90.0 mU/ml; promedio 41.25 mU/ml.) que las mujeres sin tratamiento hormonal. Únicamente en 2 la elevación fue 4 veces mayor y en 1 alcanzó a ser 10 veces mayor que la concentración de "base", en las restantes 7 mujeres varió entre 1.6 a 3.3.

Es necesario además señalar que sólo en el 60% estos picos fueron verdaderamente mesocíclicos en cambio en el resto se notó una aparición "atípicamente" precoz. Se debe puntualizar sin embargo que en estos últimos casos se produjo un acortamiento del ciclo a expensas de la primera parte del mismo.

Kesserü, Noack y Larrañaga (144) han encontrado que 28.1% de mujeres tratadas con D-Norgestrel excretaron más de 2 mg/24 hs. de pregnandiol, y 37.5% entre 1.5 a 2 mg/24 hs. sugiriendo que en un porcentaje igual se habría producido ovulación. El estudio de las biopsias de ova-

rio, de endometrio, colpocitogramas, características físico-químicas del moco cervical y la penetrabilidad espermática in vivo e in vitro (146), (147) permite llegar a la misma conclusión. Los resultados obtenidos en la determinación de LH reforzaría esta concepción.

La administración de 0.3 mg. diarios de acetato de Noretindrona ha determinado variaciones más marcadas que el D-Norgestrel, evidenciadas por un incremento de la producción "basal" de LH y desaparición de los picos mesocíclicos.

Es un hecho conocido, desde la introducción de los métodos biológicos para el dosaje de gonadotrofinas, que las mujeres menopáusicas excretan en la orina una cantidad elevada de estas hormonas. Esta situación ha sido aprovechada para producir compuestos comerciales (Humegon, Pergonal), ricos en estas hormonas, así como standards internacionales de referencia (HMG-20A, 1ª IRP, 2ª IRP). El normal devenir de la función ovárica y la consecuente disminución de las hormonas sexuales, determina una liberación del hipotálamo o hipófisis, ocasionando un incremento de estas hormonas. La administración de estrógenos ocasiona una caída de estos valores altos (11). Las concentraciones de LH de 27 a 200 mU/ml hallados en las mujeres menopáusicas está por encima de los valores de mujeres en época reproductiva, tanto de la fase folicular como luteal y concuerda perfectamente con lo observado por otros autores (11), (43), (132), (148), (149). Kohler Ross y Odell (150) han calculado que una mujer menopáusica produce 2,400 mU/minuto de LH a diferencia de las en época reproductiva (734 mU/minuto) y las tratadas con una combinación anticonceptiva de noretinodrel y mestranol (387 mU/min.).

Una situación similar aunque no igual encontramos en las mujeres que presentan insuficiencia ovárica primaria. Hemos tenido la oportunidad de examinar a dos mujeres con síndrome de Turner, en las que se suele encontrar rudimentos ováricos, que carecen totalmente de función. En estas mujeres hemos encontrado los valores más altos de LH tanto para mujeres como hombres, normales o con alteraciones de las gónadas; las cifras de 300 y 350 mU/ml. están muy por encima de la concentración presente en mujeres menopáusicas. Faiman y Ryan (149) también encuentran en un caso una concentración muy elevada de LH.

Una paciente con síndrome de Sheehan debería tener, por su edad, valores de LH en el rango de las menopáusicas, sin embargo la cifra de 2.2 mU/ml está por debajo de lo hallado en mujeres en edad reproductiva ya sea en la fase folicular como luteal, hecho que confirma la insuficiencia ovárica secundaria a déficit de gonadotrofinas ocasionada por una necrosis pituitaria post-partum (41).

Por los estudios de Odell y col. (11) se conoce que el hombre normal no presenta mayores variaciones cíclicas en la producción de LH, razón por la cual nos hemos limitado a la obtención de una sola muestra en los 114 hombres estudiados. Por otra parte hemos evitado cualquier pequeña variación circadiana mediante la obtención de sangre entre 8 a 10 a.m.

La concentración de LH en los hombres es semejante a la encontrada en mujeres durante la fase folicular, tal como ha sido reportado por Odell y col. (11) aunque nuestros valores sean relativamente más bajos. Estos autores señalan como promedio de hombres y mujeres, excluyendo en estas cifras de los picos mesocíclicos, 1.8 mug/ml. (aproximadamente a 14.4 mU/ml., en términos del 2º IRP).

No conocemos referencias anteriores de valores de LH en sangre de individuos normales de la altura, a excepción de una comunicación preliminar dada a conocer por nuestro laboratorio (151). Con un mayor número de sujetos estudiados, estamos en la situación de poder afirmar que la hipoxia de altura no tiene efecto alguno sobre la concentración de LH en el individuo perfectamente adaptado a estas condiciones ambientales. Estos hallazgos están en concordancia con el hecho irrefutable que el normal de altura tiene la misma capacidad reproductiva que el normal de nivel del mar. Campos de Rey de Castro (152) no ha encontrado cambios histológicos en los testículos de nativos de altura. Guerra-García y col. (153) han evidenciado que la producción de testosterona es igual en nativos de nivel del mar y en nativos de altura (Cerro de Pasco, 4,300 mts. sobre el nivel del mar). Sobrevilla y col. (154) no encontraron diferencias en la excreción de gonadotrofinas urinarias por un método biológico, afirman además que los espermogramas de los nativos de altura fueran normales. Todo esto tiene gran trascendencia, ya que desde muy antiguo (155) se ha observado que la exposición aguda a la hipoxia de altura determina cambios en la fertilidad de varias especies animales, incluyendo al humano (156), (157), (158), aparentemente este efecto no es directo sobre los espermatozoides, ya que estos conservan su capacidad generativa cuando son transportados de nivel del mar a la altura (159). Donayre y col. (160) en un grupo de 10 sujetos de nivel del mar llevados a una altura de 4,300 encontraron una disminución significativa del número de espermatozoides. Guerra-García y col. (161), (162) demostraron en este mismo grupo de sujetos que la excreción urinaria de testosterona bajaba importantemente en el tercer día de exposición a la altura. Con el trabajo de Sobrevilla y Midgley (163) se ha podido encontrar una explicación definitiva a este fenómeno; los autores en referencia demostraron una caída de la concentración tanto de FSH como LH también en el tercer día de exposición a la hipoxia de altura; confirman en esta forma la teoría de San Martín concebida muchos años atrás (156) de que la disminución de las gonadotrofinas era responsable de la disminución de la fecundidad señalada anteriormente.

Concordante con ello es el hallazgo de Aliaga (164), quien comunicó que las gonadotrofinas séricas tenían un efecto protector del epitelio germinativo testicular de conejo llevados a la altura.

Klinefelter, Reifstein y Albright en 1942 (42) definieron el síndrome del mismo nombre como un cuadro clínico caracterizado por ginecomastia, azoospermia con conservación de las células intersticiales de Leydig y una excreción elevada de gonadotrofinas. Años más tarde se comprobó que estos pacientes tenían una alteración cromosomal, evidenciable por

la presencia anormal de cromatina sexual nuclear y el hecho de tener en él mayoría de casos 47 cromosomas en vez de 46, esta anomalía está dada por un cromosoma supernumerario. Los tres casos que hemos estudiado llenan todas las características anteriormente, a excepción de que no se les ha determinado el cariotipo. Las gonadotrofinas urinarias medidas mediante el método biológico de Albert se encontraron muy elevadas. El hallazgo de una concentración de LH superior a 18 mU/ml en estos pacientes fenotípicamente masculinos, muy por encima de la cifra promedio de 10.8 mU/ml de los normales, no hace pues sino confirmar lo que se había esperado en estos casos. Faiman y Ryan (149) han encontrado una concentración elevada de LH en un paciente con insuficiencia gonadal primaria.

En cuatro pacientes, cuyo hipogonadismo fue catalogado como secundario a un déficit de gonadotrofinas en base a la determinación de estas hormonas en orina por el método de Albert, la concentración de LH en sangre no fue detectable por encontrarse por debajo de la sensibilidad del método (1.25 mU/ml.). Uno de estos pacientes corresponde a la forma clínica conocida como síndrome de Kallman, consistente en la asociación de hipogonadismo hipogonadotrófico con anosmia. Se señala que cuando un paciente con hipogonadismo con anosmia significa que tiene un déficit de gonadotrofinas. En el estudio de estos pacientes nos ha faltado determinar LH durante la administración de clomifeno y dosar testosterona antes y después de la administración de HCG, que están previstas para un futuro cercano.

Por lo expuesto anteriormente podemos deducir fácilmente, que una vez vencidos los obstáculos concernientes a la introducción de una nueva metodología, como es el dosaje radioinmunológico, estos procedimientos pueden ser de una utilidad grande, para dilucidar aspectos importantes tanto de la fisiología como de la patología humanas.

En el caso concreto de la presente tesis, estos métodos nos han permitido establecer las concentraciones de insulina tanto en condiciones basales como después de la administración de glucosa, en individuos normales de nivel del mar, como en aquél que vive sometido a una baja tensión de oxígeno y que constituye un porcentaje importante de nuestra población, más del 50% vive encima de los 2,000 mts. de altura (165). Se ha podido demostrar que la glicemia baja del nativo de altura no es dependiente de una mayor producción de insulina.

La reproducción es función esencial de la vida. En los mamíferos es indispensable una adecuada interrelación hipotálamo-hipofiso-gonadal, donde las gonadotrofinas hipofisarias son una llave intermedia necesaria. La hormona luteinizante es fundamental para la función normal de las células intersticiales de Leydig, productoras de testosterona en el testículo, y es esencial para la ruptura del folículo en el ovario, en el proceso conocido como ovulación.

En la mujer el hipotálamo, hipófisis y ovarios funcionan cíclicamente. La hormona luteinizante en las mujeres normales hemos visto que se eleva mensualmente en la mitad del ciclo menstrual. Por otra parte estos

métodos nos han permitido demostrar que el hombre normal de altura adaptado a esas condiciones ambientales, produce una cantidad igual de LH que el sujeto de nivel del mar.

Consideramos que estas nuevas técnicas han abierto en nuestro medio otros campos de investigación, que permitirán la explicación de otros problemas propios.

VI. RESUMEN

La tesis destaca la importancia de emplear métodos radioinmunológicos para el dosaje de polipéptidos y proteínas de acción hormonal, dado que son procedimientos específicos y de una sensibilidad que permite cuantificar estas sustancias, pese a encontrarse en concentraciones tan bajas como 10^{-10} molar. En esta forma han desplazado a los métodos biológicos y los inmunológicos basados en reacciones visibles de precipitación o aglutinación.

La utilización de las técnicas radioinmunológicas ha permitido descubrir, explicar y aún modificar numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos de la Endocrinología. Se ha extendido su campo de aplicación al dosaje de sustancias proteicas sin actividad hormonal y aún a compuestos no proteicos, de por sí sin efecto antigénico, como los esteroides.

Describe los aspectos generales y más importantes de esta metodología, tanto en sus fundamentos como en su programación. Señala la necesidad de contar con hormonas muy puras, que servirán de antígenos tanto para la producción de anticuerpos, como para que puedan ser marcadas con isótopos radioactivos, en la actualidad sustancialmente yodo, y sirvan de marcadores o tracers, en la reacción antígeno-anticuerpo del procedimiento mismo o como standards.

La selección del antisuero por su concentración y afinidad. La importancia de una adecuada marcación de la hormona, su ulterior purificación. Se dan detalles sobre la incubación, separación de la hormona unida al anticuerpo de aquella que queda libre, dando cuenta de los procedimientos más comunmente empleados; así mismo el proceso de la cuantificación y cálculo.

La tesis abarca dos aspectos principales: metodología y dinámica del método radioinmunológico y en segundo su aplicación clínica. Respecto a la metodología se hacen alcances sobre los puntos críticos de estas técnicas, sus fundamentos y bases teóricas, principalmente en aquellos en los que el autor ha ganado experiencia personal durante su entrenamiento, especialmente en lo concerniente a la marcación de la hormona.

Con el objeto de estudiar los factores que intervienen en la marcación de la hormona se ha utilizado el procedimiento de la radiocromatografía. Se ha encontrado que es fundamental utilizar el buffer de marcación a un pH 7.5, que la hormona se conserve congelada a temperatura muy baja, se evite reiteradas descongelaciones y no se la tenga en esta situación mucho tiempo, siendo preferible almacenarla seca a refrigeración, realizando diluciones periódicas. Se ha visto que la marcación a altas actividades en sí no es factor importante de daño de la capacidad inmunoreactiva de la hormona siempre y cuando la solución que contiene el yodo radioactivo esté libre de contaminantes reductores y tenga la mayor riqueza posible del elemento radioactivo. La incorporación de átomos de yodo estable determinó disminución de la eficiencia de marcación, de la activi-

dad específica y de la capacidad inmunoreactiva del preparado. El tiempo de marcación no fue crítico en el experimento llevado a cabo, pero se recomienda que sea lo más breve posible, en la situación de no conocer la calidad de la solución de marcación.

La experiencia personal sucesiva del autor con los procedimientos de la radiocromatoelectroforesis, carbón revestido con dextran, precipitación por métodos químicos y el método del doble anticuerpo le ha permitido recomendar esta última técnica por su aplicación al dosaje de cualquier tipo de hormona, la factibilidad de utilizar I-125, que por su tiempo medio de vida de 60 días es muy conveniente para emplearlo en nuestro país, por su buena reproducibilidad y por no requerir instalaciones ni equipo costosos.

En la parte correspondiente a la aplicación clínica se ha dosado insulina y hormona luteinizante (LH) por los métodos de doble anticuerpo de Morgan y Lazarow y de Odell, Ross y Rayford, respectivamente con pequeñas modificaciones.

La insulina en sangre se dosó a 24 normales de nivel del mar y 23 normales de altura (La Oroya, 3,730 mts. sobre el nivel del mar), a quienes se practicó un test de tolerancia de glucosa, administrando 1.75 grs/kg de peso.

La insulinemia basal fue de 9.2 uU/ml. para los de nivel del mar (rango 0 a 16 uU/ml.) y 9.76 uU/ml. para los de altura (rango 0 a 43 uU/ml).

La máxima concentración se alcanzó a los 30 minutos en los de nivel del mar (81.74 ± 8.05 uU/ml.) y a los 60 minutos en los de altura (77.12 ± 10.82 uU/ml.). Decayendo posteriormente la insulinemia en ambos grupos hasta los 180 minutos que duró el test, pero sin alcanzar los valores basales.

Tanto la insulinemia absoluta como su correlación con la glicemia no fue estadísticamente diferente en ambos grupos.

Teniendo en cuenta que la glicemia basal en los de altura fue más baja, se concluye que ésta no es dependiente de una mayor producción de insulina y se interpreta que existe una mayor utilización de glucosa a nivel celular por directa acción de la hipoxia.

El estudio del ciclo menstrual, en 21 mujeres normales mediante la determinación de LH en sangre, evidenció 2 ciclos claramente anovulatorios y uno sospechoso; una cuarta mujer fue descontada por haber gestado.

En 17 mujeres se encontró elevaciones mesocíclicas de LH expresión de ciclos bifásicos ovulatorios. La concentración de LH en la fase folicular (8.93 ± 0.38 mU/ml.) fue mayor que en la fase luteal (7.43 ± 0.55 mU/ml.). La elevación mesocíclica máxima fluctuó entre 27 a 130 mU/ml. (promedio 79.97 ± 7.92 mU/ml.).

La administración de 200 mg. de enantato de noretindrona a 19 mujeres normales por vía intramuscular, cuyo efecto anticonceptivo dura 12 se-

manas, determinó cambios importantes en la concentración de LH. Sólo 2 de 16 mujeres tratadas mostraron pequeños picos mesocíclicos de LH durante el 1º mes. Se notó un incremento gradual de LH en los siguientes 2 meses; en el tercero la concentración global alcanzó a 14.4 mu/ml., mayor de la hallada en fase folicular o luteal. Ocasionalmente se sorprendieron picos mesocíclicos durante el 3º mes de tratamiento.

En la dosis oral continua de 0.03 mg. diarios, el D-Norgestrel ocasionó a 10 mujeres una elevación de LH en la primera y segunda fase del ciclo y una depresión del pico mesocíclico, presente en 9 de las 10 mujeres estudiadas. El acetato de noretindrona produjo efectos más marcados en otras 5 mujeres.

En cinco mujeres menopáusicas la concentración de LH estuvo entre 27 a 200 mU/ml. mucho mayor que lo encontrado en las mujeres controles, a excepción de la elevación ovulatoria.

Esta misma situación, pero de mayor magnitud, se observó en 2 mujeres con insuficiencia ovárica primaria correspondiente al síndrome de Turner (300 y 350 mU/ml.).

En una paciente con síndrome de Sheehan (hipopituitarismo por necrosis hipofisarias post-partum) la cifra de LH fue 2.2 mU/ml. por debajo de lo normal, pese a encontrarse en época menopáusica.

En 70 hombres normales de nivel del mar se halló una concentración promedio de LH de 10.83 ± 0.52 mU/ml., que estadísticamente no fue distinta a un grupo similar de altura (11.81 ± 0.69 mU/ml.).

En tres pacientes con insuficiencia testicular primaria, correspondiente al síndrome de Klinefelter, la LH varió entre 18 a 80 mU/ml. en cambio no fue posible detectar LH en la sangre de 4 pacientes considerados como portadores de una insuficiencia testicular secundaria.

VII. CONCLUSIONES

1. Los métodos radioinmunológicos son procedimientos no solamente muy útiles, sino indispensables, para el dosaje de hormonas en la sangre, por ser específicos y sensibles.
2. La marcación de la hormona con iodo radioactivo, sea I-131 o I-125, es un paso crítico en la efectividad del método.
3. La marcación de las hormonas a alta actividad específica, de por si no daña la capacidad inmunoreactiva de ellas por el contrario es necesaria para la obtención de una adecuada sensibilidad. Al agregarse al medio de incubación una pequeña masa, ésta no competirá inadecuadamente con la hormona no marcada para saturar los sitios de enlace del anticuerpo.
4. La presencia de iodo estable o de otros contaminantes especialmente cuerpos reductores, en la solución que contiene el elemento radioactivo, disminuye la eficiencia de marcación, la actividad específica de la hormona marcada y también su capacidad inmunoreactiva. De donde se desprende que un elemento esencial en la marcación es la calidad de la solución que contiene el iodo radioactivo.
5. El tiempo de marcación no es tan crítico como la pureza de la solución de marcación.
6. La técnica de doble anticuerpo ha mostrado ser la más factible de emplearse en nuestro medio, por no requerir instalaciones y equipos de complicado mantenimiento y mucho costo; además de ser muy reproducible, sensible, proporcionar la posibilidad de usar I-125 con tiempo medio de vida prolongado y la potencialidad de poderla utilizar en el dosaje de cualquier hormona.
7. La concentración basal de insulina en 24 hombres normales de nivel del mar fue de 9.2 ± 1.31 uU/ml, que se elevó a una concentración máxima de 81.74 ± 8.05 uU/ml. a los 30 minutos de la administración de 1.75 grs. de glucosa/kg. de peso.
8. La concentración basal de insulina en 23 hombres normales de altura. (La Oroya, 3,730 mts. sobre el nivel del mar), 9.76 ± 2.33 uU/ml. no fue diferente a los de nivel del mar, pese a que la glicemia de los primeros fue significativamente menor que la de los segundos. Tampoco se encontró diferencia importante en las variaciones de insulina durante el test de tolerancia de la glucosa.
9. En 17 mujeres normales se encontró que la LH sufre variaciones durante el ciclo menstrual. Durante la fase folicular es más alta (8.93 ± 0.38 mU/ml.) que durante la fase luteal (7.43 ± 0.55 mU/ml.) en términos del 2º Preparado Internacional de Referencia (2nd. IRP); pero en la mitad del ciclo se produce una elevación considerable de la misma (79.97 ± 7.92 mU/ml.) en relación con la ovulación.

10. La administración intramuscular de 200 mg. de enantato de noretindrona produjo abolición de los picos ovulatorios en 14 de 16 mujeres estudiadas en el primer mes, de los 3 que dura su efecto anticonceptivo. Posteriormente en el 2º y 3º mes se nota un incremento gradual de la concentración de LH. Ocasionalmente en los 3 meses se han podido observar picos mesocíclicos.
11. El d-Norgestrel determina aumento de LH en la primera y segunda fase del ciclo y disminución importante de las elevaciones mesocíclicas, que se observaron en 9 de 10 mujeres controladas.
12. El acetato de noretindrona determinó efectos más marcados que el d-Norgestrel en parte referibles a la dosis 10 veces mayor.
13. En mujeres menopáusicas la LH se encuentra elevada en sangre.
14. En dos casos de insuficiencia ovárica primaria correspondiente al síndrome de Turner se hallaron los valores más altos (300 y 350 mU/mi.).
15. En un caso de síndrome de Sheelan la LH estuvo subnormal.
16. La concentración de LH en 70 hombres normales de nivel del mar fue 10.83 ± 0.52 mU/ml.
17. No se encontró diferencia en la concentración de LH de 44 hombres normales de altura (Morococha, 4,540 mts. sobre el nivel del mar), 11.81 ± 0.69 mU/ml., en comparación con los de nivel del mar.
18. En tres casos de insuficiencia testicular primaria, correspondiente al síndrome de Klinefelter, la cifra de LH en sangre se encontró elevada.
19. Cuatro pacientes con insuficiencia testicular secundaria no presentaron LH dosable por el método utilizado cuya sensibilidad alcanza a 1.25 mU/ml. de plasma o suero.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.— Greenspan F. S., Li C. H., Simpson M. E. y Evans H. M.: Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinology* 45: 455-463, 1949.
- 2.— Vallance-Owen J., Hurlock B. y Please N. W.: Estimation of plasma insulin *Lancet* 1: 983-990, 1954.
- 3.— Renold A. E., Martin D. B., Dagenais Y. M., Steinke J., Nickersen R., Sheps M. C. y Lauris V.: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. *J. Clin. Invest.* 39: 1487-1498, 1960.
- 4.— Garmendia F., Vaubel W. E. y Pfeiffer R. F.: Ueber das Verhalten der endogenen ACTH-Akivitact in menschlichen Plasma nach enzymatischer Blockade der Cortisol-Synthese mit Metopiron (SU 4885). I. Mitteilung Untersuchungen an Stoffwechselgesunden. *Klin. Wnschr.* 41: 317-321, 1963.
- 5.— Cantarow A. y Schepartz B.: *Biochemistry*, 3rd. edition, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1962.
- 6.— Murphy B. E. P., Engelberg W. y Pattee C. J.: Simple method for the determination of plasma corticoids. *J. Clin. Endocr.* 23: 293-300, 1963.
- 7.— Kobayashi J., Lobotsky J. y Lloyd C. W.: Plasma testosterone and urinary 17-ketosteroids in Japanese and occidentals. *J. Clin. Endocr.* 26: 610-614, 1966.
- 8.— Abraham G. E., Swerdloff R., Tulchinsky D. y Odell W. D.: Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J. Clin. Endocr.* 32: 619-624, 1971.
- 9.— Yalow R. S. y Berson S. A.: Immunossay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 1157-1175, 1960.
- 10.— Sutton J., Young J. D., Lazarus L. Hickie J. B., Garmendia F., y Velásquez T.: The hormonal response to altitude. *Lancet* 2: 1194, 1970.
- 11.— Odell W. D., Ross G. T. y Rayford P. L.: Radioimmunoassay for luteinizing hormone in human plasma or serum: physiological studies. *J. Clin. Invest.* 46: 248-255, 1967.
- 12.— Wide L. y Gemzell C. A.: An immunological pregnancy test, *Acta endocr. (Copenh.)* 35: 261-266, 1960.
- 13.— Read y Bryan C. T.: Immunological studies of human growth hormone. *Ciba Found. Coll. Endocr.* 13: 68-72, 1960.
- 14.— Berson S. A., Yalow R. S., Bauman A., Rothschild M. A. y Newerly K.: Insulin-I-131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin. *J. Clin. Invest.* 35: 170-190, 1956.
- 15.— Steiner D. F., Cunningham K., Spiegelman L. y Aten B.: Insulin biosynthesis, evidence for a precursor. *Science* 157: 697-700, 1967.
- 16.— Steiner D. F., Cho S., Bayliss C. y Hallund O.: Isolation and some properties of bovine proinsulin. *Diabetes* 17: 309, 1968.
- 17.— Clark J. y Steiner D. F.: The biosynthesis of insulin in the rat. *Fed. Proc.* 27: 393, 1968.
- 18.— Steiner D. F., Hallund O., Rubenstein A., Cho S. y Bayliss C.: Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms and other minor components from crystalline bovine insulin. *Diabetes* 17: 725-736, 1968.
- 19.— Roth J., Gorden P. y Pastan I.: "Big insulin" a new component of plasma insulin detected by immunoassay. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61: 138-145, 1968.

- 20.—Rubenstein A. H., Cho S., y Steiner D. F.: Evidence for proinsulin in human urine and serum. *Lancet* 1:1353, 1968.
- 21.—Click S. M., Roth J., Yalow R. S. y Berson S. A.: The regulation of growth hormone secretion. *Recent Prog. Hor. Res.* 21: 241-283, 1965.
- 22.—Pfeiffer E. F.: Intestinale Hormone und Insulinsekretion. *Verhandl. Deutsch. Ges. Inn. Med.* 75: 296-315, 1969.
- 23.—Greenwood F. C., Hunter W. M. y Glover J. S.: The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123, 1963.
- 24.—Hales C. N. y Randle P. J.: Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. *Biochem. J.* 88: 137-146, 1963.
- 25.—Morgan C. R. y Lazarow A.: Immunoassay of insulin: two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 12: 115-126, 1963.
- 26.—Morgan C. R., Sorenson R. L. y Lazarow A.: Further studies of an inhibitor of two antibody immunoassay system. *Diabetes* 13: 579-584, 1964.
- 27.—Herbert V., Lau E. S., Gottlieb C. W. y Bleicher S. J.: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocr.* 25: 1375-1384, 1965.
- 28.—Grodsky G. M. y Forsham P. M.: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 1070-1079, 1960.
- 29.—Odell W. D., Wilber J. P. y Paul W. E.: Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. *J. Clin. Endocr.* 25: 1179-1195, 1965.
- 30.—Meade R. C. y Klitgaard H. N.: A simplified method for immuno-assay of human serum insulin. *J. Nucl. Med.* 3: 407-416, 1962.
- 31.—Rosselin G., Assan R., Yalow R. S. y Berson S. A.: Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with Iodine-131 by talcum powder and precipitated silica. *Nature (London)* 212: 355-359, 1966.
- 32.—Catt K., Niall N. D. y Tregear G. W.: Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone. *Biochem J.* 100: 31c-33c, 1966.
- 33.—Berson S. A., Yalow R. S., Click S. M. y Roth J.: Immunoassay of protein and peptide hormones. *Metabolism* 13: 1135-1153, 1964.
- 34.—Gray C. H. y Bacharach A. L.: *Hormones in Blood*, 2d. edición, Academic Press, London y New York, 1968.
- 35.—Yalow R. S. y Berson S. A.: *Methods of Biochemical Analysis*. Immunoassay of plasma insulin. Interscience Publishers, New York, 12: 69-96, 1964.
- 36.—Somogyi A.: A method for preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 86: 655-663, 1930.
- 37.—Nelson N. A.: A photometric adaptation of Somoyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380, 1944.
- 38.—Somoyi M.: Notes en sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23, 1952.
- 39.—Albert A.: III. Pituitary Hormones: human urinary gonadotropin. *Recent Prog. Horm. Res.* 12: 227-238, 1956.
- 40.—Turner M. H.: A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology* 23: 566-570, 1938.
- 41.—Sheehan H. L. y Summers V. K.: The syndrome of hypopituitarism. *Quart. J. Med.* 18: 319, 1949.

- 42.—Klinefelter H. G. Jr., Reifenstein E. C. Jr. y Albright F.: Syndrome characterised by gynecomastia, aspermatogenesis without a-Leydigism and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J. Clin. Endocr.* 2: 615, 1942.
- 43.—Llerena L. A., Guevara A., Lobotsky J., Lloyd C. W., Weisz J., Pupkin M., Zañartu J. y Puga J.: Concentration of luteinizing and follicle-stimulating hormone in peripheral and ovarian venous plasma. *J. Clin. Endocr.* 29: 1083-1089, 1969.
- 44.—Thomas y Ferin J.: A new rapid radioimmunoassay for HCG (LH, ICSH) in plasma using dioxan. *J. Clin. Endocr.* 28: 1667-1670, 1968.
- 45.—Unger R. N., Eisentraut A. M., McCall M. S., Keller S., Lanz M.C. y Madison L. L. Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.* 102: 612-623, 1959.
- 46.—Utiger R. D., Parker M. L., y Daughaday W. M.: Human serum growth hormone measurement of concentration and turnover with radio-immunoassay. *J. Clin. Invest.* 40: 1086, 1961. Abstr.
- 47.—Berson S. A., Yalow R. S., Aurbach G. D., y Potte J. T. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 49: 613-617, 1963
- 48.—Felber J. P.: ACTH antibodies and their use for radioimmunoassay for ACTH. *Experientia* 19: 227-229, 1963.
- 49.—Midgley A. R. Jr. y Ram J. S.: Radioimmunoassay of human chorionic gonadotropin (HCG) and human pituitary luteinizing hormone (LH). *Fed. Proc.* 24: 162, 1965.
- 50.—Rosselin G. y Dolais J. Dosage del hormone folliculo-stimulante humaine (H.F.S.M.) par la methode radio-immunologique. *La Presse Medicale* 75: 2027-2030, 1967.
- 51.—Kaplan S. L. y Grumbach M. M.: Immunoassay for human chorionic "growth hormone-prolactin" in serum and urine. *Science* 147: 751-753, 1965.
- 52.—Roth J., Glick S. M., Klein L. A. y Petersen M. J.: Specific antibody to vasopressin in man. *J. Clin. Endocr.* 26: 671-675, 1966.
- 53.—Glick S. M., Wheeler M., Kagan A. y Kumerasan P.: Radioimmunoassay of oxytocin. *Pharmacology of hormonal polypeptides and proteins.* Plenum Press., N. Y., 93-100, 1968.
- 54.—McGuigan J. E.: Measurement of hypergastrinemia in the Zollinger Ellison syndrome. *Clin. Res.* 16: 288, 1968. Abstrc.
- 55.—Abraham G. E., Swerdloff R. S., Tulchinsky D., Hopper K. y Odell W. E.: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocr.* 33: 42-46, 1971.
- 56.—Young J. D., Lazarus L., Chistoholm D. J. y Athinson F. F. V.: Secretin and pancreaticozymín-cholecystokínin after glucose. *Lancet* 2: 914-915, 1968.
- 57.—Young J. D., Lazarus L. y Chistoholm D. J.: Radioimmunoassay of secretin in human serum. *J. Nuclear Med.* 9: 641-642, 1968.
- 58.—Cadwell B. V., Burstein S., Brock W. A. y Speroff L.: Radioimmunoassay of F Prostaglandins. *J. Clin. Endocr.* 33: 171-175, 1971.
- 59.—Glick S. M. y Kagan A.: Combined immunoassay of insulin and human growth hormone. *J. Clin. Endocr.* 27: 133-136, 1967.
- 60.—Young J. D. y Kraegen E. W.: Simultaneous assay of insulin and glucagon in serum. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 46: 697-705, 1968.
- 61.—Berson S. A. y Yalow R. S.: Iodoinsulin used to determine specific activity of iodine-131. *Science* 152: 205-206, 1966.

- 62.—Yalow R. S. y Berson S. A.: Labelling of proteins. Problems and practices. Trans. N. Y. Acad. Sci. 28: 1033-1044, 1966.
- 63.—Hunter W. M.: Iodination of protein compounds. En *Symposium on Radioactive Pharmaceuticals*, Ed. Andrews, Knisely y Wagner, U.S. Atomic Energy Commission, pp. 245-264, 1966.
- 64.—Brunfel K., Hansen B. A. y Jorgensen K. R.: The immunological reactivity and biological activity of iodinated insulin. *Acta endocr. (Copenh)* 57: 307-329, 1968.
- 65.—Quimby E. H. y Feitelberg S.: *Radioactive isotopes in Medicine and Biology. Basic Physics and Instrumentation*, Lea y Febiger, segunda edición inglesa, Philadelphia, 1963.
- 66.—Garmendia F.: Determinación radioinmunológica de insulina. Comparación de métodos. *Simpósio sobre Hormonas Proteicas. II Congreso Bolivariano de Endocrinología*, Litográfica del Perú S. A., pp. 23-28, Lima, 1970.
- 67.—Samols E. y Bilkus D.: A comparison of insulin immunoassays. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 79, 1964.
- 68.—Soeldner J. S. y Slone D.: Critical variables in radioimmunoassay of serum insulin using double antibody technic. *Diabetes* 14: 771-779, 1965.
- 69.—Welborn T. A., Rubenstein A. H., Harslam R. y Fraser F.: Normal insulin response to glucose. *Lancet* 1: 280, 1966.
- 70.—Hunter W. M., Willoughby J. N. T. y Strong J. A.: Plasma insulin and growth hormone during 22 hour fast and following graded glucose loads in six healthy adults. *J. endocrinol.* 40: 297-311, 1968.
- 71.—Yalow R. S. y Berson S. A.: Dynamics of insulin secretion in hypoglycemia. *Diabetes* 14: 341-348, 1965.
- 72.—Cahill G. F. Jr., Herrera M. G., Morgan A. P., Soeldner J. S., Steinke J., Levy P. L., Reichart G. A. Jr. y Kipnis D. M.: Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J. Clin. Invest.* 45: 1751-1969, 1966.
- 73.—Pfeiffer E. F., Ditschuneit H. y Ziegler R.: Ueber die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose. *Klin. Wnschr.* 39: 415-426, 1961.
- 74.—Seltzer H. S. y Smith W. L.: Plasma insulin activity after glucose: an index of insulinogenic reserve in normal and diabetic man. *Diabetes* 8: 417, 1959.
- 75.—Froesch E. R., Burgi F. H., Ramsier F. B., Bally P. y Labhart A.: Antibody suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiological significance: an insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. Clin. Invest.* 42: 1816-1934, 1963.
- 76.—Yalow R. S. Black H., Villazon M. y Berson S. A.: Comparison of plasma insulin levels following administration of tolbutamide and glucose. *Diabetes* 9: 356-362, 1960.
- 77.—Perley M. y Kipnis D. M.: Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetics and nondiabetic subjects. *Diabetes* 15: 867, 1966.
- 78.—Seltzer H. S., Allen E. W., Herron A. L. Jr. y Brennan M. T.: Insulin secretion in response to glycemic stimulus. Relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 46: 323, 1967.
- 79.—Samols E.: Immunochemical aspects of insulin. En *On the nature and treatment of diabetes*. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam, pp. 227-246, 1965.

- 80.—Yalow R. S., Glick S. M., Roth J. y Berson S. A.: Plasma insulin and growth hormone levels in obesity and diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 131: 357, 1965.
- 81.—Forbes W. H.: Blood sugar and glucose tolerance at high altitude. *Am. J. Physiol.* 116: 309-316, 1936.
- 82.—San Martín M. S.: Distribución de la glucosa sanguínea y su variación con el cambio de altitud. *An. Fac. Ciencias Médicas, Lima*, 23: 312, 1940.
- 83.—Monge C. C.: Glucosa, ácido láctico y ácido pirúvico a nivel del mar y en el altura. *An. Fac. Med., Lima* 32: 1-28, 1949.
- 84.—Picon-Reátegui E.: Studies on the metabolism of carbohydrate at sea level and high altitudes. *Metabolism* 11: 1148-1154, 1962.
- 85.—Calderón R. y Llerena L. A.: Carbohydrate metabolism in people living in chronic hypoxia. *Diabetes* 14: 100-105, 1965.
- 86.—Picon-Reátegui E.: Efecto de la exposición crónica a la altura sobre el metabolismo de los hidratos de carbono. *Arch. Inst. Biol. Andina* 1: 255-286, 1966.
- 87.—Olivera A., Díaz N., Ibáñez C. y Lozano E.: Niveles de glucosa endoglobular y plasmática en humanos y otras especies animales. *Rev. Med. Cir. (Trujillo)* 1: 190, 1963.
- 88.—McDonald G. W., Fisher G. F. y Burham C. E.: Differences in glucose determinations obtained from plasma or whole blood. *Public Health Rep.* 79: 515, 1964.
- 89.—Dillon R. S.: Importance of the hematocrit in interpretation of blood sugar. *Diabetes* 14: 672-674, 1965.
- 90.—Zaidman J. y Hormazábal J.: Influencia del hematocrito en los valores de glucemia. *Rev. Chilena Pediat.* 37: 923-930, 1966.
- 91.—Garmendia F., Arroyo J. y Muro M.: Glicemia del nativo normal de altura. *Arch. Inst. Biol. Andina* 3: 209-216, 1970.
- 92.—Garmendia F., Arroyo J., Torres J. y Muro M.: Modificación experimental de la glicemia en nativos normales de altura. 2do. Coloquio Peruano-Boliviano sobre adaptación a la Altura "Carlos Monge M.", Lima, 1971.
- 93.—Sutton J., Garmendia F., Young J. D., Lazaruz L. y Hickie J. B.: Influencia de la hipoxia de altura sobre la concentración de glucagon en sangre. En preparación.
- 94.—Muñoz M.: Efectos de la gestación y de la hipoxia sobre el metabolismo de los ácidos grasos libres. Tesis de Bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 1970.
- 95.—Randle P. J.: Plasma insulin activity in acromegaly. *Lancet* 1: 441, 1954.
- 96.—Cerasi E. y Luft R.: Insulin response to glucose loading in acromegaly. *Lancet* 2: 769-771, 1964.
- 97.—Beck P., Schalch D. S., Parker M. L., Kipnis D. M. y Daughaday W. H.: Correlative studies of growth hormone and insulin plasma concentrations with metabolic abnormalities in acromegaly. *J. Lab. Clin. Med.* 66: 366-379, 1965.
- 98.—Samols E., Marri G. y Marks V.: Promotion of insulin secretion by glucagon. *Lancet* 2: 415, 1965.
- 99.—Crockford P. M., Porte D. Jr., Wood F. C. Jr. y Williams R. H.: Effect of glucagon on serum insulin, plasma glucose and fatty acids in man. *Metabolism* 15: 114-122, 1966.

- 100.—Schalch D. S. y Kipnis D. M.: Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma nonsterified fatty acids. *J. Clin. Invest.* 44: 2010, 1965.
- 101.—Pi-Sunyer F. X., Hashim S. A. y Van Itallie T. B.: Insulin and ketone responses to ingestion of medium and long-chain triglycerides in man. *Diabetes* 18: 96-105, 1969.
- 102.—Hales C. N., Randle P. J. y Walker J. B.: The structure and metabolism of pancreatic islets. Brolin, Hellman y Knutson eds., Pergamon, London, p. 491, 1964.
- 103.—McIntyre N., Holdsworth C. D. y Turner D. S.: New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 2: 2021, 1964.
- 104.—Elrick H., Stimmeler L., Hlad C. J. Jr. y Arai Y.: Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J. Clin. Endocr.* 24: 1076-1082, 1964.
- 105.—Samols E., Tyler J., Marri G. y Marks V.: Stimulation of glucagon secretion by oral glucose. *Lancet* 2: 1257, 1259, 1965.
- 106.—Lawrence A. M.: Radioimmunoassayable glucagon levels in man: effects of starvation, hypoglycemia and glucose administration *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55: 316-320, 1966.
- 107.—Valverde I., Ripopoulou D., Exton J., Ohneda A., Eisentraut A. y Unger R. H.: Demonstration and characterization of a second fraction of glucagon-like immunoreactivity in jejunal extracts. *Am. J. Med. Sci.* 255: 415-420, 1968.
- 108.—Zunz E. y LaBarre J.: Hyperinsulinémie consecutive a l'injection de solution de secretine nonhyposensitive. *Soc. Biol.* 98: 1435, 1928. Citado por Pfeiffer (22).
- 109.—Pfeiffer E. F., Telib M., Ammon J., Melani F. y Ditschuneit H.: Direkte Stimulierung der Insulin-Sekretion in vitro durch Sekretin. *Deut. Med. Wschr.* 90: 1663, 1965.
- 110.—Unger R. H., Ketterer H., Eisentraut A. y Dupré J.: Effect of secretin on insulin secretion. *Lancet* 2: 24-27, 1966.
- 111.—Dupré J., Rojas L., White J. J., Unger R. H. y Beck J. C.: Effect of secretin on insulin and glucagon in portal and peripheral blood in man. *Lancet* 2: 26-27, 1966.
- 112.—Meade R. C., Kneubuhler H. A., Schulte W. J. y Barboveale J. J.: Stimulation of insulin secretion by pancreozymin. *Diabetes* 16: 141-144, 1967.
- 113.—Unger R. H., Ketterer M., Dupré J. y Eisentraut A. M.: Effects of secretin, pancreozymin and gastrin on insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs. *J. Clin. Invest.* 46: 630, 1967.
- 114.—Unger R. H., Ohneda A., Azuilar-Parada E. y Eisentraut A. M.: The role of aminogenic glucagon secretion in blood glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 48: 810, 1969.
- 115.—Murphy J.: Erythrocyte metabolism. *J. Lab. Clin. Med.* 55: 286-302, 1960.
- 116.—Hurtado R. y Aste-Salazar H.: Arterial blood gases and acid-base balance at sea level and at high altitudes. *J. Appl. Physiol.* 1A: 304, 1948.
- 117.—Monge M. C. y Monge C. C.: High altitude diseases. Mechanism and Management. Ch. C. Thomas, Springfield, 1966.
- 118.—Evans H. M., Simpson M. E., Tolksdorf S. y Jensen H.: Biological studies of the gonadotropic principles in sheep pituitary substance. *Endocrinology* 25: 529-546, 1939.
- 119.—Payne R. W., Runser R. H., Hagans J. y Morrison R. D.: Assay of follicle-stimulating hormone in the hypophysectomized estrogen-treated immature female rat. *Endocrinology* 65: 389-394, 1959.
- 120.—Steelman S. L. y Pohley F. M.: Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 53: 604-616, 1953.

- 121.—Parlow A. F.: A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH secretion. *Fed. Proc.* 17: 402, 1958.
- 122.—Bell E. T., Mukerji S. y Loraine J. A.: A new bioassay method for luteinizing hormone depending on depletion of rat ovarian cholesterol. *J. Endocrinol.* 28: 321-328, 1964.
- 123.—Paesi F. J. A., de Jongh S. E., Hoogstra M. J. y Engelbregt A.: The follicle-stimulating hormone-content of the hypophysis of the rat as influenced by gonadectomy and oestrogen treatment. *Acta Endocr. (Copenh.)* 19: 49-60, 1955.
- 124.—McArthur J. W.: The identification of pituitary interstitial cell-stimulating hormone in human urine. *Endocrinology* 50: 304-310, 1952.
- 125.—Greep R. O., Van Dyke H. B. y Chow B. F.: Gonadotropin of swine pituitary. I. Various biological effects of purified thylokrentin (FSH) and pure metakrentin (ICSH). *Endocrinology* 30: 635-649, 1942.
- 126.—Loraine J. A. y Brown J. B.: Some observations on the stimulation of gonadotrophins in human urine. *Acta Endocr. (Copenh.)* 17: 250-263, 1954.
- 127.—Wide L., Roos P., y Gemzell C.: Immunological determination of human pituitary luteinizing hormone (LH). *Acta endocr. (Copenh.)* 57: 445-449, 1961.
- 128.—Hartree S. A., Butt W. R. y Kirkhan K. E.: The separation and purification of human luteinizing and thyrotropic hormones. *J. Endocrinol.* 29: 6169, 1964.
- 129.—Wide L. y Gemzell C.: Immunological determination of pituitary luteinizing hormone in urine of fertile and post-menopausal women and adult men. *Acta endocr.* 39: 539, 1962.
- 130.—Odell W. D., Ross G. T. y Rayford P. L.: Radioimmunoassay for human luteinizing hormone. *Metabolism* 15: 287-289, 1966.
- 131.—Schalch D. S., Parlow A. F., Boon R. C. y Reichlin S.: Measurement of human luteinizing hormone in plasma by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 47: 665-678, 1968.
- 132.—Aono T., Goldstein D. P., Taymor M. L. y Dolch K. A.: Radioimmunoassay method for luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophic (HCG) using 125-I-labelled LH. *Amer. J. Obst. Gynec.* 98: 996-1001, 1967.
- 133.—Wilde C. E., Orr. A. H., Bagshawe, K. D.: Radioimmunoassay for human chorionic gonadotrophin and luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 37: 23-35, 1965.
- 134.—Lazarus L. y Young J. D.: Radioimmunoassay of luteinizing hormone in human serum. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 46: 791-794, 1968.
- 135.—Catt K. J., Niall H. D., Tregear G. W. y Burger H. G.: Disc solidphase radioimmunoassay of human luteinizing hormone. *J. Clin. Endocr.* 28: 121-126, 1968.
- 136.—Grogginani P. G., Nakamura R. M., Hovland D. N. y Mischell D. R. Jr.: A method of solid phase radioimmunoassay utilizing polypropylene discs. *J. Clin. Endocr.* 30: 153-160, 1970.
- 137.—Bedoya M., Kesserü, E. y García M.: Efectos de diversos contra conceptivos sobre la ovulación a través del estudio morfológico del ovario. *Ginec. Obst., Lima* 13: 177-192, 1967.
- 138.—Louchart J., Truffert J. y DeCourt J.: Dosage de l'hormone luteinizante dans le plasma humain. Resultats chez les sujets normaux des deux sexes. *Acta endocr. (Copenh.)* 49: 293-298, 1965.

- 139.—Butt, W. R., Cunningham, S. Hartree A. S.: Preparation and assay of human pituitary FSH and LH. *Proc. Roy Soc. Med.* 57: 107, 1964.
- 140.—Faiman Ch. y Ryan R. J.: Serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentrations during the menstrual cycle as determined by radioimmunoassay. *J. Clin. Endocr.* 27: 1711-1716, 1967.
- 141.—Larrañaga A. Kesserü E.: Dos años de experiencia clínica con enantato de noretisterona como anticonceptivo inyectable de depósito. *Ginec. Obst., Lima* 14: 204-221, 1968.
- 142.—Diczfalusy E., Goebelsmann V., Johannisson E., Tillinger K-G y Wide L.: Pituitary and ovarian function in women on continuous low dose progestagens; effect of chlormadinone acetate and norethisterone. *Acta endocr. (Copenh.)* 62: 697-693, 1969.
- 143.—Kesserü E. y Larrañaga A.: Mecanismo de acción de los contraceptivos inyectables de depósito. *Rev. Ginec. Obst., Lima* 14: 339-359, 1968.
- 144.—Kesserü E. Noack P. y Larrañaga A.: Urinary pregnandiol during the use of different contraceptive methods. *Acta endocr. Panam.* 2: 73-90, 1971.
- 145.—Hurtado H., Kesserü E. y Larrañaga A.: D-Norgestrel, un progestágeno a microdosis como anticonceptivo oral de administración continua. *Ginec. Obst., Lima* 16: 119-126, 1970.
- 146.—Kesserü E.: Recuperación espermática intracervical e intrauterina bajo tratamiento con diversos anticonceptivos hormonales e intrauterinos. *Simposios del II Congreso Bolivariano de Endocrinología, Litográfica del Perú S. A., Lima*, 120-135, 1970.
- 147.—Kesserü E., Larrañaga A., Hurtado H. y Benavides G.: Fertility control by continuous administration of d-Norgestrel, 0.03 mg. En prensa. *International Journal of Fertility*, 1972.
- 148.—Boon R. C., Schalch D. S., Lee L., Reichlin S. y Parlow A.: The measurement of human luteinizing hormone (HLH) levels in plasma by radioimmunoassay. *Obstet. Gynec.* 29: 429-430, 1967.
- 149.—Faiman Ch. y Ryan R. J.: Radioimmunoassay for human luteinizing hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125: 1130-1133, 1967.
- 150.—Kohler P. O., Ross G. T. y Odell W. D.: Metabolic clearance and production rates of human luteinizing hormone in pre and post menopausal women. *J. Clin. Invest.* 47: 38-47, 1968.
- 151.—Garmendia F., Llerena L. A. y Kesserü E.: Concentración sanguínea de LH en sujetos normales y en pacientes con hipofunción gonadal. *Resúmenes de las IV Jornadas Peruanas de Endocrinología, Trujillo*, p. 40, 1971.
- 152.—Campos Rey de Castro J.: Preliminary report on anatomic studies at high altitude. *Air University School of Aviation Medicine. Report* 97, 1935.
- 153.—Guerra-García R., Velásquez A. y Whittembury J.: Urinary testosterone in high altitude natives. *Steroids* 6: 351-355, 1965.
- 154.—Sobrevilla L. A., Romero I., Moncloa F., Donayre J. y Guerra García R.: Endocrine studies at high altitude. III. Urinary gonadotrophins in subjects native to and living at 14,000 feet and during acute exposure of men living at sea level to high altitude. *Acta. Endocr. (Copenh.)* 56: 369-375, 1967.
- 155.—Calancha A.: *Crónica moralizadora de la Orden de San Agustín, Barcelona*, 1639.

- 156.— San Martín M. y Atkins J.: Estudios sobre la fertilidad del ganado lanar en la altura. An. Fac. Med., Lima 25: 41-54, 1942.
- 157.— Monge M. C., San Martín M., Atkins J. y Castañón J. Fertilidad e infertilidad reversible durante la fase adaptativa. An. Fac. Medicina, Lima 28: 15-31, 1945.
- 159.— Accame F. O.: Efectos de presiones barométricas bajas sobre el semen de carneros. An. Fac. Medicina, Lima 28: 65-90; 1945.
- 160.— Donayre J., Guerra-García R., Moncloa F. y Sobrevilla L. A.: Cambios seminales en sujetos expuestos a la altura. VI Congreso Panamericano de Endocrinología, Resumen N° 135, Excerpta Médica Foundation, International Congress Series N° 99, México, 1965.
- 161.— Guerra-García R., Donayre J., Sobrevilla L. A. y Moncloa F.: Cambios en la testosterona urinaria de sujetos expuestos a la altura. VI Congreso Panamericano de Endocrinología, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series N° 99, Resumen N° 130, México, 1965.
- 162.— Guerra-García R.: Testosterone metabolism in men exposed to high altitude. Acta Endocr. Panam. 2: 55-64, 1971.
- 163.— Sobrevilla L. A. y Midgley A. R.: The plasma gonadotropin response to acute high altitude exposure. Acta Endocr. Panam. 2: 47-53, 1971.
- 164.— Aliaga R.: Algunos aspectos de la relación adreno-testicular en la costa y en la altura y efecto del tratamiento con gonadotrofina sérica. Tesis de Bachillerato, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 1955.
- 165.— Vásquez C. L., Parlin W. y Simonson E.: Distribución altitudinal de la población peruana. Informe preliminar. Arch. Inst. Biol. Andina 2: 150-155, 1967.

UNMSM - FM - UBHCD

